Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

PH 228

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

9

1980

I. N. R. A.
SERVICE DE DOCUMENTATION
25. OCT. 1982
UNITE CENTRALE DE VERSAILLES

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-10

C.R. Ann. Trav. Lab. Biochimie 9 (1980)

T A B L E D E S M A T I E R E S

INTRODUCTION.

Première Partie : COMPTE-RENDU SCIENTIFIQUE.

I- Travaux Analytiques.(M. BOUNIAS)

. Réactif Glucides.

. C.C.M. acides aminés - lipides - nucléotides - adrénaline et dérivés - cations.

. Etalonnages/^{14}C par autoradiographie sur C.C.M.

. Ouvrage sur la Nano-C.C.M. quantitative (fin de mise au point).

II- Achèvement du programme : Ac. ASCORBIQUE/DEHYDROASCORBIQUE.(M. BOUNIAS)

III- Variations de la lipémie au cours du développement de l'Abeille (M. BOUNIAS)

IV- Biochimie de la survie et de la mort des larves d'Abeilles placées dans diverses conditions traumatiques. (M. BOUNIAS et M. DEBEVEC)

V- Altération de l'action hyperglycémiante de l'Adrénaline chez l'Abeille par autoxydation partielle en adrénochrome. (M. BOUNIAS et I. KRUK)

VI- Mécanismes d'action du tréhalose sur les cinétiques p.N.P.α-D-glucosidasiques de l'hémolymphe d'Abeilles. (M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN)

. Cas michaëliens.

. Cas non michaëliens.

VII- Variabilité inter-raciale de la glycémie chez l'Abeille. (M. BOUNIAS)

VIII- Perspectives.

Deuxième Partie : COMPTE-RENDU ADMINISTRATIF.

. Bilan 1980 : équipement / fonctionnement / gestion.

. Nouvelles structures.

PUBLICATIONS 1980.

CONCLUSIONS.

ANNEXE.

INTRODUCTION

L'année 1980 marque l'aboutissement de l'ensemble des travaux sur la " Régulation de la Glycémie - et ses Applications - chez l'Abeille ". Il reste, certes, un important travail de dépouillement des résultats expérimentaux (ceux de 1979, en particulier) mais l'essentiel peut être considéré comme acquis. Au delà des confirmations obtenues au niveau de la variabilité inter-raciale de la glycémie de l'Abeille, du rôle de l'adrénochrome et des travaux de fin de mise au point technique, qui ont permis l'achèvement fin avril de l'ouvrage sur la Nano-chromatographie quantitative, c'est une phase de ré-orientation vers de nouvelles applications qui a été amorcée, avec d'une part la poursuite des travaux sur l'induction des α-glucosidases (en relations avec le Professeur Morgan, Lancaster, U.K.) et d'autre part, le début d'une collaboration à long terme abordée avec l'Université de Belgrade (Chaire de Biologie, Fac. des Sc. Médicales et Vétérinaires) à la demande du Professeur Popeskovič, dans le cadre d'accords gouvernementaux. Dès le mois de mai, MRS Debevec, M. Sc., Ass. Prof., a été reçue au Laboratoire de Biochimie pour une période de 3 mois de formation et mise en route d'un programme de recherches. M. Bounias s'est ensuite rendu, en août, en Yougoslavie, pour examiner avec le Professeur Popeskovič les modalités pratiques de la collaboration établie, ainsi que de l'enseignement qu'il doit, en principe, assurer à Belgrade comme Professeur Associé.

Les diverses fluctuations administratives survenues depuis le début de 1980 n'ont donc pas altéré la productivité du Laboratoire, dont les résultats et les orientations scientifiques actuelles ont justifié un changement de rattachement structurel, approuvé par une commission d'experts réunie sur place le 3 décembre.

P r e m i è r e P a r t i e

COMPTE-RENDU SCIENTIFIQUE

I- TRAVAUX ANALYTIQUES. (M. BOUNIAS)

a) Réactif des Glucides.

L'étude des propriétés remarquables du N (Naphtyl-1) éthylène-diamine dichlorhydrate, comme réactif des glucides en C.C.M. a abouti à une publication dans Analytical Biochemistry : 1980, 106, 291-295. Les résultats mettent en évidence les avantages suivants :

. fond blanc (très favorable à la densitométrie) et polychromie.
. sensibilité : de 10 à 50 picomoles.
. précision : de 6 à 0,25 % relatifs, entre 60 et 80.000 picomoles.
. correlations entre paramètres d'étalonnage et structure moléculaire des glucides.

b) Mise au point de méthodes complémentaires.

La chromatographie des amino-acides sur couches préfabriquées de silice et de cellulose (en relation avec le chap. II) a été approfondie en début d'année, et les résultats d'ensemble ont été publiés dans Analusis : 1980, 8, 287-295, ainsi qu'au colloque INRA de Theix.

Les recherches sur la C.C.M. quantitative des lipides ont été poursuivies classe par classe. Ce travail a été étendu à d'autres classes biochimiques parmi lesquelles : les nucléotides (AMP, AMP cycl., ADP, ATP), l'adrénaline et ses précurseurs, les vitamines hydro-solubles, ainsi que les cations. Les résultats suivants sont encore inédits et font partie de l'ouvrage décrit dans le paragraphe d).

- VITAMINES HYDROSOLUBLES.

Les tableaux 1 et 2 indiquent les principaux solvants ainsi que les paramètres d'étalonnage avec divers réactifs. Les figures 1 et 2

Tableau 1 - Mobilité de quelques vitamines hydro-solubles sur couches de silice (MERCK).

(Rf d'après 1 migration de 0 cm).

vitamines	éluants							
	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]
B1	0,02	0,08	0,02	0,05	0,01	0,21	0,05	0,34
B2 (HCl)	0,34	0,55	0,15	0,50	0,62	0,62	0,66	0,87
B2*.....	0,34	0,55	0,29	0,50	0,62	0,62	0,16	0,68
B6	0,48	0,66	0,36	0,57	0,21	0,67	0,25	0,76
B12	0,42	0,57	0,16	0,30	0,35	0,55	0,49	0,89
C	0,55	0,77	0,41	0,79	0,42	0,03	0,53	0,84
H	0,40	0,63	0,19	0,09	...	0,14	0,46	...
Acide folique	0,29	0,56	0,16	0,07	0,29	0,09	0,35	0,86
Pantothénate	0,375	0,34	0,18	0,16	0,12	0,34	0,08	0,63

* Préparation pharmaceutique "Hydro-sol".

Eluants :

[1] Méthyl-éthyl-cétone - Méthoxy-2-éthanol - Benzène - Acide acétique - Eau (20-20-20-20-20).

[2] Méthyl-éthyl-cétone - Méthoxy-2-éthanol - Eau (40-30-30).

[3] n-Butanol - Méthanol - Eau (60-20-20).

[4] n-Butanol - Pyridine - Eau (35-45-20).

[5] " " " (50-30-20).

[6] Méthoxy-2-éthanol - Acétonitrile - Eau (40-30-30).

[7] " " " " (35-45-20).

[8] Pyridine - Eau - Acide acétique (50-30-20).

Tableau 2 - Paramètres d'étalonnage de quelques vitamines hydro-solubles d'après leur coloration naturelle (C.N.) ou l'act des divers réactifs suivants : (1) acide phosphomolybdique, (2) ferricyanure de potassium, (3) ninhydrine.

(Echelle D.O. : 0 → 0,5).

(L.S. = limite de sensibilité).

composés	réaction	x	p $(cm^2)^x$/nmole	
				L.S.
Vitamine C	(1)	1,67	3,7	0,01
Vitamine B12	C.N.	1,25	0,841	0,06
" "	(2)	1,24	0,635	0,08
" "	(2) + (3)	1,10	0,549	0,10
Vitamine B6	C.N.	1,44	0,020	2,5
" "	(2)	1,37	0,018	3,0
" "	(2) + (3)	1,26	0,012	4,0
Vitamine B1	(2) + (3)	1,05	0,437	0,10

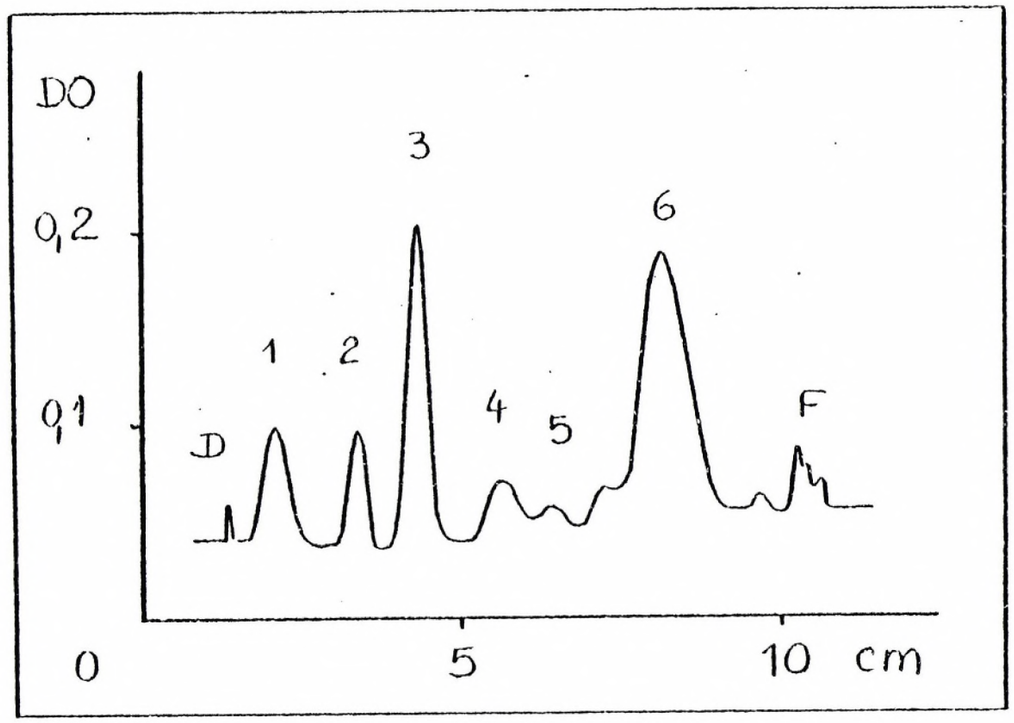


fig. 1 - Application de la chromatographie des vitamines hydro-solubles sur couche de silice à l'analyse d'une préparation pharmaceutique.

D = départ
1 = vitamine B1 (1 µg)
2 = acide pantothénique (2 µg)
3 = vitamines B12 (4 µg)
4 = vitamine B2 (0,75 µg)
5 = vitamine B6 (1 µg)
6 = vitamine C (25 µg)
F = front de solvant.

Eluant : nº 4

Révélation : ferricyanure puis ninhydrine.

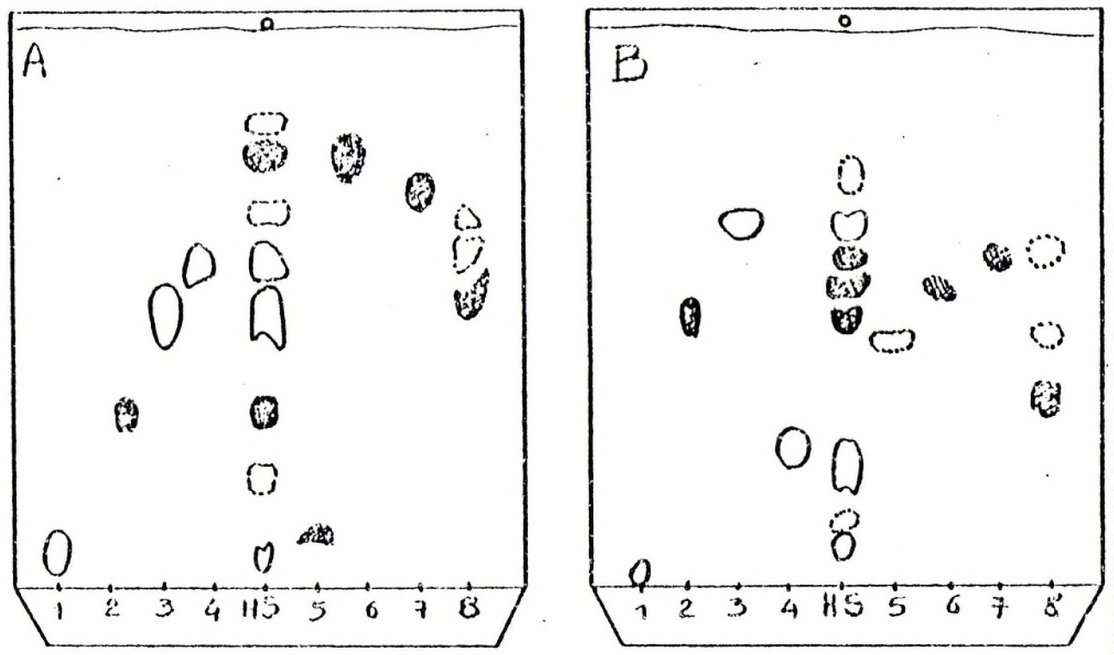


fig. 2 - Chromatographie des vitamines hydro-solubles sur couches d'alumine.

A : éluant nº 4 ; B : éluant nº 7 (tableau 39).

1 = vitamine B1
2 = vitamine B12
3 = vitamine B2
4 = vitamine B6
5 = vitamine H (biotine)
6 = vitamine C (acide ascorbique)
7 = acide pantothénique
8 = acide folique.

H5 = préparation pharmaceutique de vitamines hydro et lipo-solubles

Réactif : U.V., ferricyanure puis ninhydrine (voir texte).

illustrent les chromatogrammes et la figure 3 présente quelques courbes d'étalonnage.

- NUCLEOTIDES.

Quelques propriétés chromatographiques de l'ATP et ses dérivés sont présentées dans le tableau 3, et les figures 4 et 5 montrent un exemple de chromatogramme ainsi que de courbes d'étalonnages appliqués à des extraits d'Abeille.

- HORMONES ADRENERGIQUES.

Les tableaux 4 et 5 présentent quelques propriétés chromatographiques ainsi que les paramètres d'étalonnage des catécholamines. Les figures 6 et 7 illustrent des enregistrements longitudinaux et transversaux, et la figure 8 présente un exemple de chromatogramme appliqué à l'Abeille.

- CATIONS.

Les figures 9 et 10 illustrent quelques chromatogrammes et enregistrements photométriques. Les paramètres d'étalonnage sont illustrés par la figure 11 et le tableau 6.

Les données originales concernant les lipides, les nucléotides et les hormones, doivent faire l'objet de 3 notes dans la revue Analusis (en accord avec le Professeur Rosset, rédacteur en Chef).
Les manuscrits sont attendus " dès que possible " !

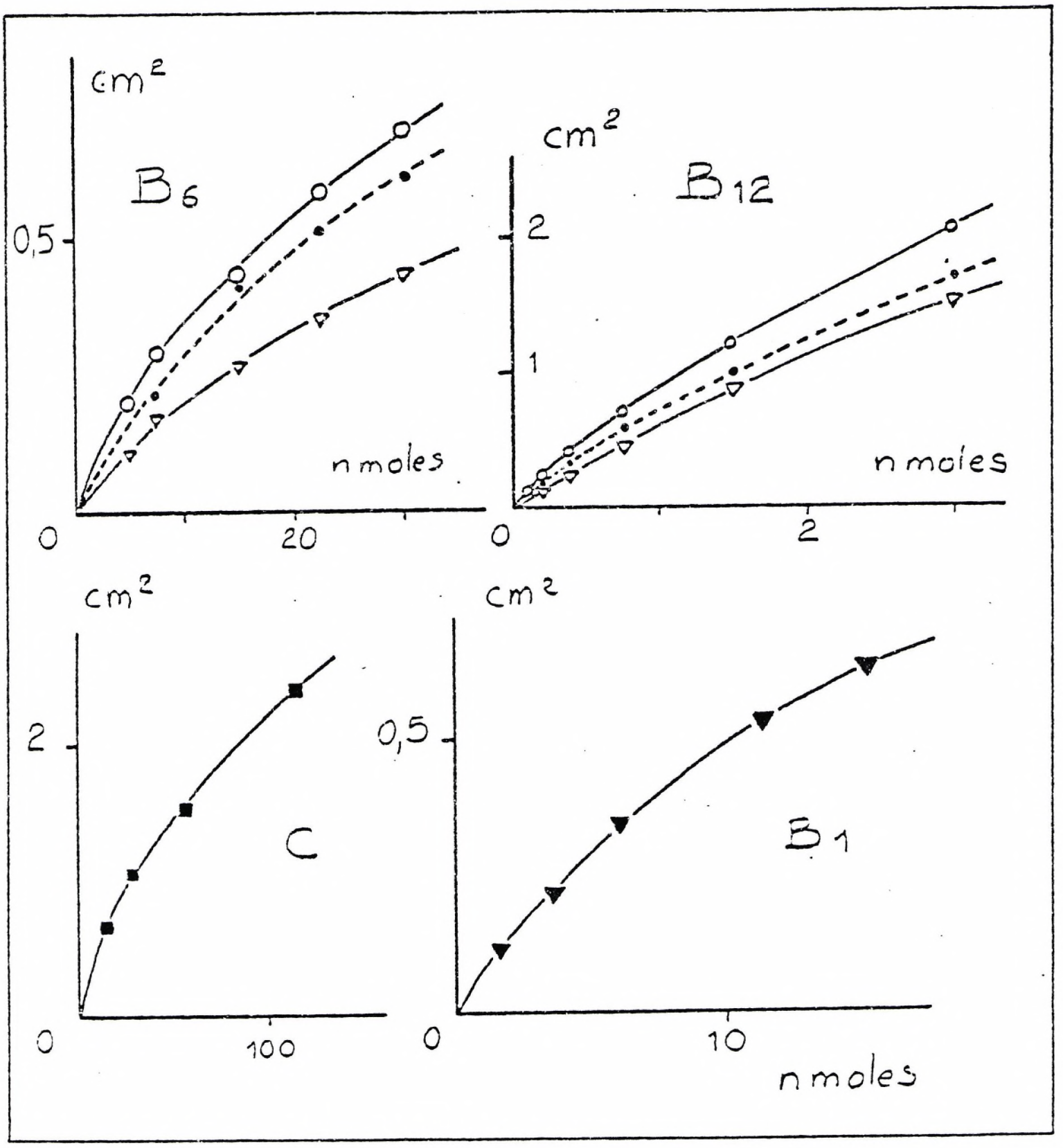


fig. 3 - Exemples d'étalonnage de quelques vitamines hydrosolubles sur plaques de silice (MERCK) avec différents réactifs.

Vitamines B6 et B12 : (○) naturelle — (●) ferricyanure — (▽) ninhydrine (successivement).

Vitamine C : acide phosphomolybdique (■).

Vitamine B1 : ninhydrine (▼).

Tableau 3 - Chromatographie des nucléotides sur couches de cellulose (deux migrations de 3 cm et 8 cm successivement).
Les Rf sont exprimés relativement au front le plus haut.

Composés	Rf / solvants n°s ...		
	(1)	(2)	(3)
ATP	0,17	0,15	0,04
ADP	0,23	0,24	0,06
AMP	0,44	0,47	0,16
AMP cyclique	0,50	0,50	0,35

Solvants éluants :

(1) n-butanol - acide acétique - eau (40-40-20).

(2) " " " (35-50-15).

(3) n-butanol - méthyl-éthyl-cétone - acide acétique - eau (30-20-30-20).

Tableau 4 - Chromatographie des hormones adrénergiques sur couches de silice (MERCK) tamponnées et imprégnées de bisulfite. (Rf après 1 migration de 8 cm). La plus petite différence de mobilité nécessaire pour la résolution de 2 taches est : $\delta = 0,04$.

composés	éluants				
	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
Adrénaline	0,30	0,22	0,39	0,48	0,52
Nor-adrénaline	0,43	0,24	0,42	0,40	0,46
Dopamine	0,46	0,31	0,33	0,52	0,57
Dopa	0,35	0,13	0,40	0,29	0,31

Eluants :

[1] n-butanol - ac.acétique - eau (60-20-20).

[2] " " " (75-15-10).

[3] méthoxy-2-éthanol - ac.acétique - eau (70-15-15).

[4] acétonitrile - ac.acétique - eau (70-15-15).

[5] n-butanol - acétonitrile - ac.acétique - eau (30-45-15-10).

Tableau 5 - Paramètres respectifs d'étalonnage des hormones adrénergiques et du tryptophane avec leurs réactifs respectifs.

composés	dichloro-2-6-quinone chloroimide			ninhydrine		
	x	p $(cm^2)^x$/nmole	limite de sensibilité nmole	x	p $(cm^2)^x$/nmole	limite de sensibilité nmole
Adrénaline ...	1,0004	0,273	0,015	(1)	0,225	0,02
Nor-adrénaline	1,25	0,224	0,02	(1,2)	0,130	0,03
Dopamine	1,15	0,273	0,015	(1,1)	0,470	0,01
Dopa	1,24	0,409	0,01	(1,2)	0,070	0,005
Tryptophane ..	(1,2)	0,015*	0,3	1,21	0,736*	0,006
Proline	—	0	—	1,0	0,250	0,02
Autres amino-acides	—	0	—	voir chap.III (x = 1,1 à 2,1 ; p = 1 à 10)		

* Le rapport $\frac{0,736}{0,015} \simeq 50$ permet de considérer la ninhydrine comme relativement spécifique du tryptophane.

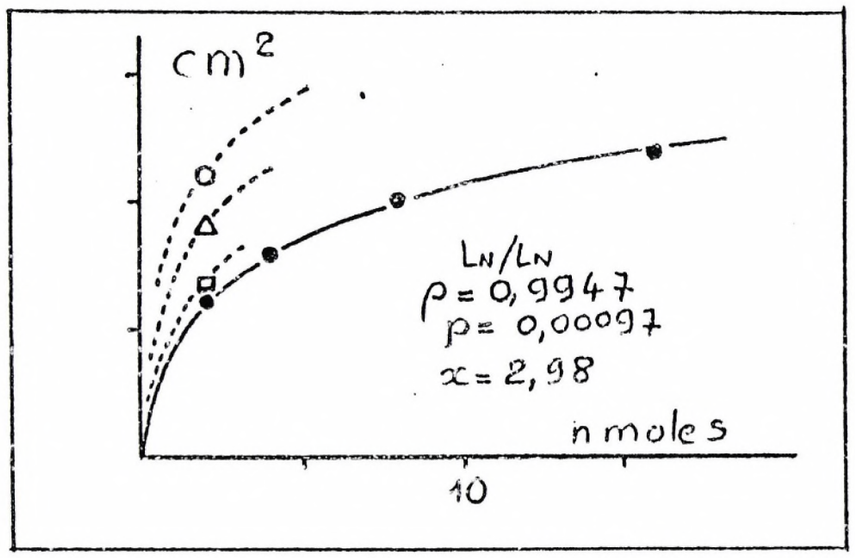


fig. 4 - Etalonnage des nucléotides d'après la surface plane des pics observés en lumière U.V. à 254 nm, sur couches de cellulose.
● = ATP □ = ADP Δ = AMP ○ = AMP Cyclique.

Teneurs observées chez l'Abeille comparativement au criquet (selon Achazi et al., 1977, Insect Biochem., 7, p.21).

	Abeille	Criquet
ATP	0,26 mM	6 mM
ADP	0,15 mM	2 mM
AMP	0,30 mM	3 mM
AMP cyclique ..	0,09 mM	0,01 mM

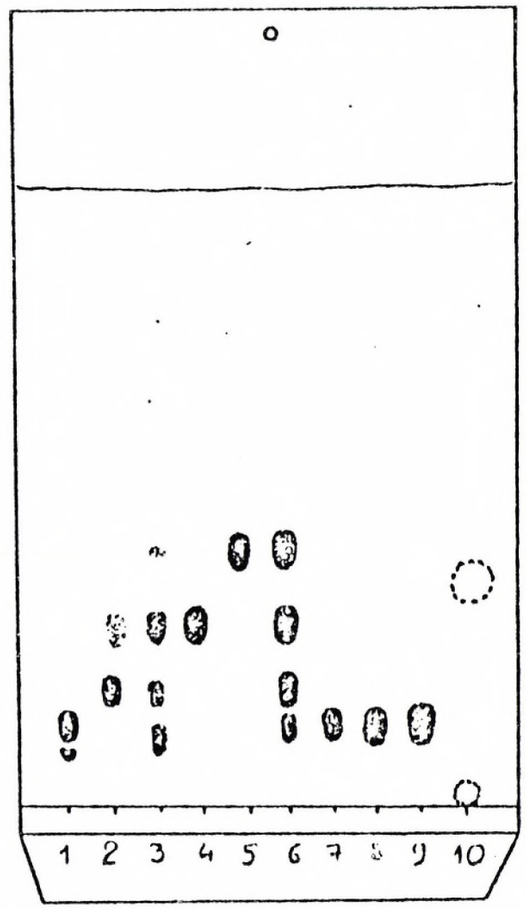


fig. 5 - Application de la chromatographie des nucléotides sur couches de cellulose à l'analyse d'organes d'Abeille.

1 = ATP 4 nmoles
2 = ADP 4 nmoles
3 = muscles thoraciques (2 mg)
4 = AMP 4 nmoles
5 = AMP Cyclique 4 nmoles
6 = mélange de 1 + 2 + 4 + 5
7 = ATP 2 nmoles
8 = ATP 8 nmoles
9 = ATP 16 nmoles
10 = extrait abdominal d'Abeille.

Observation en lumière U.V. 254 nm : taches bleues sur fond gris

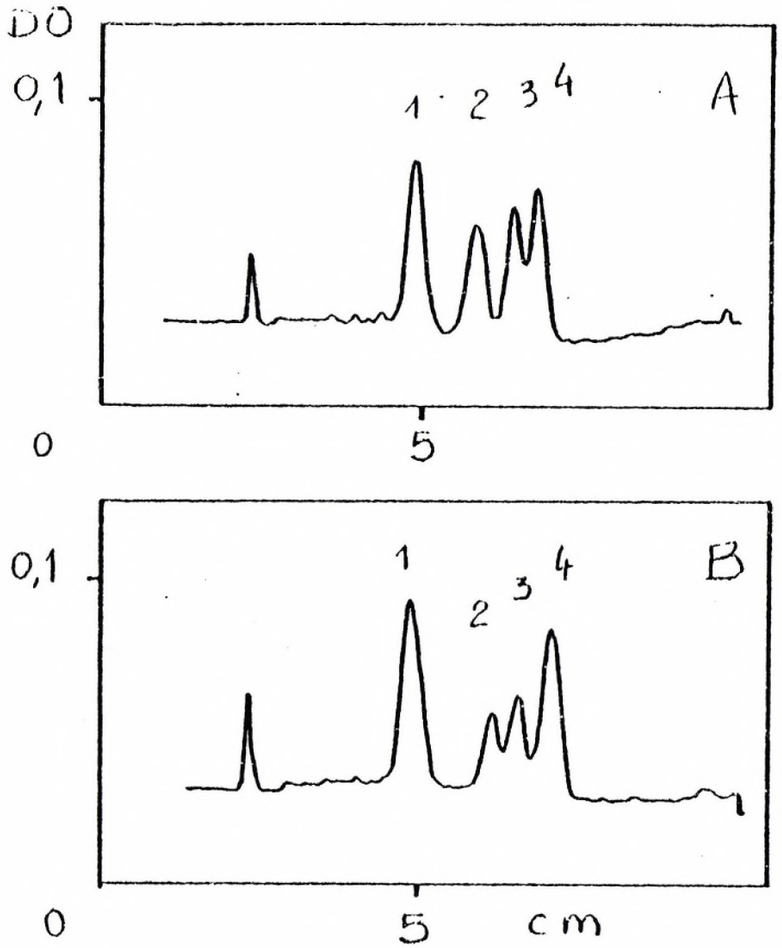


fig. 6 - Chromatographie de l'adrénaline et ses précurseurs sur couches de silice tamponnées à pH 6,8 (phosphates 0,4 M avec bisulfite 10 mM).

1 = dopa 3 = adrénaline

2 = nor-adrénaline 4 = dopamine

0,4 nanomoles de chaque.

Réactif : dichloro-quinone-chloro-imide.

Eluants : A = acétonitrile - acide acétique - eau (70-15-15).

B = n-butanol - acétonitrile - acide acétique - eau (30-45-15-10).

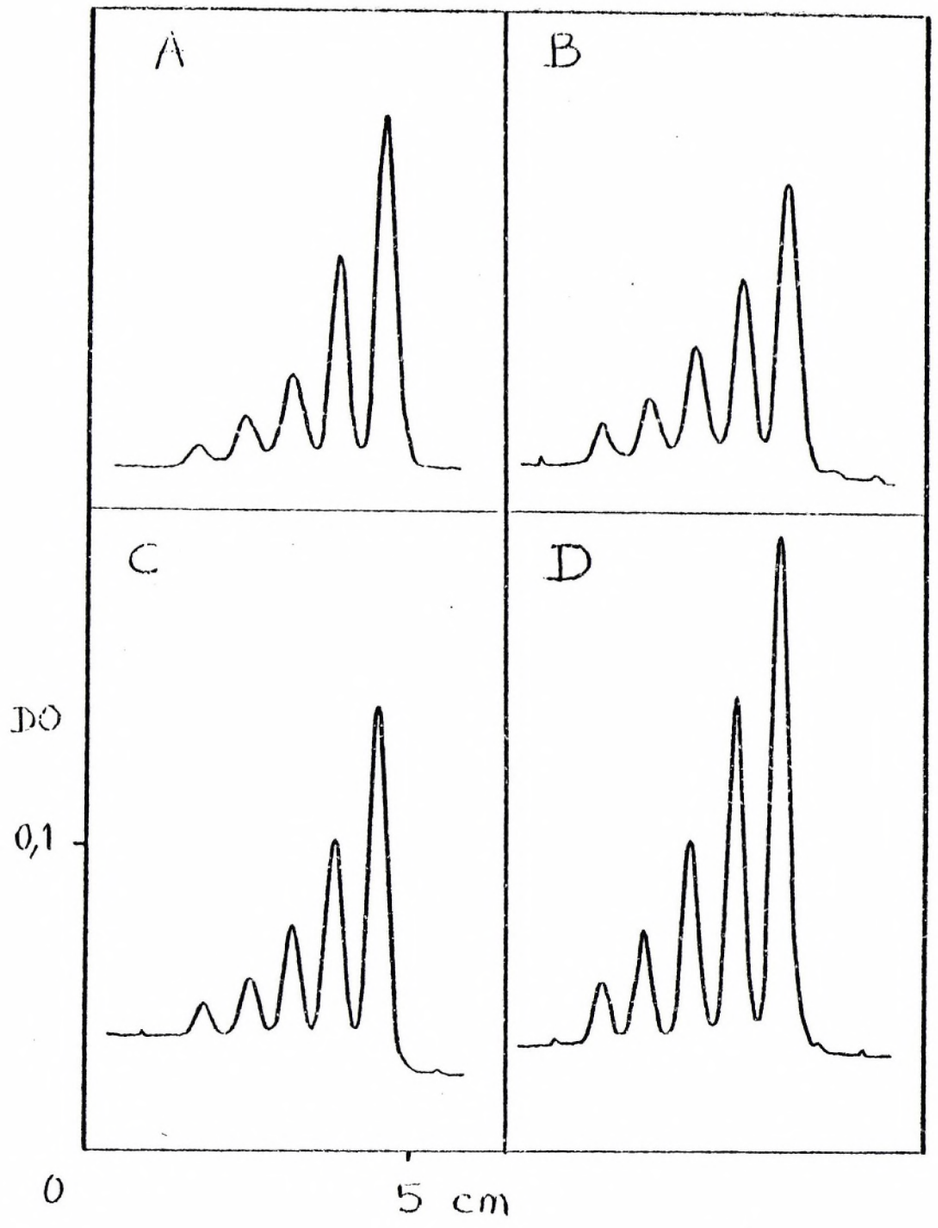


fig. 7 - Gammes d'étalonnage de l'adrénaline (A), de la nor-adrénaline (B), de la dopamine (C) et de la dopa (D) sur couches de silice tamponnées et imprégnées de bisulfite.

Révélation : dichloro-2-6-quinone chloro-imide.

Quantités déposées (nmoles) : 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2.

fig. 8 - Etude chromatographique de l'adréneline et de ses précurseurs dans des extraits d'organes d'Insectes.

Couches de silice tamponnées et imprégnées de bisulfite.

Eluant : n-butanol - acétonitrile - acide acétique - eau (25-50-15-10).

Plaque A : révélation à la dichloro-2-6-quinone chloro-imide. (DQC)

Plaque B : révélation à la ninhydrine. (NNH)

1 = adréneline (0,8 nmole)
2 = noradrénaline (0,8 nmole)
3 = dopamine (0,8 nmole)
4 = dopa (0,8 nmole)
5 à 9 = gamme (1+2+3+4)
0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2 nmole.
x = abdomens d'abeilles
y = têtes d'abeilles

10 - 11 - 12 - 13 = solutions étalons d'amino-acides.

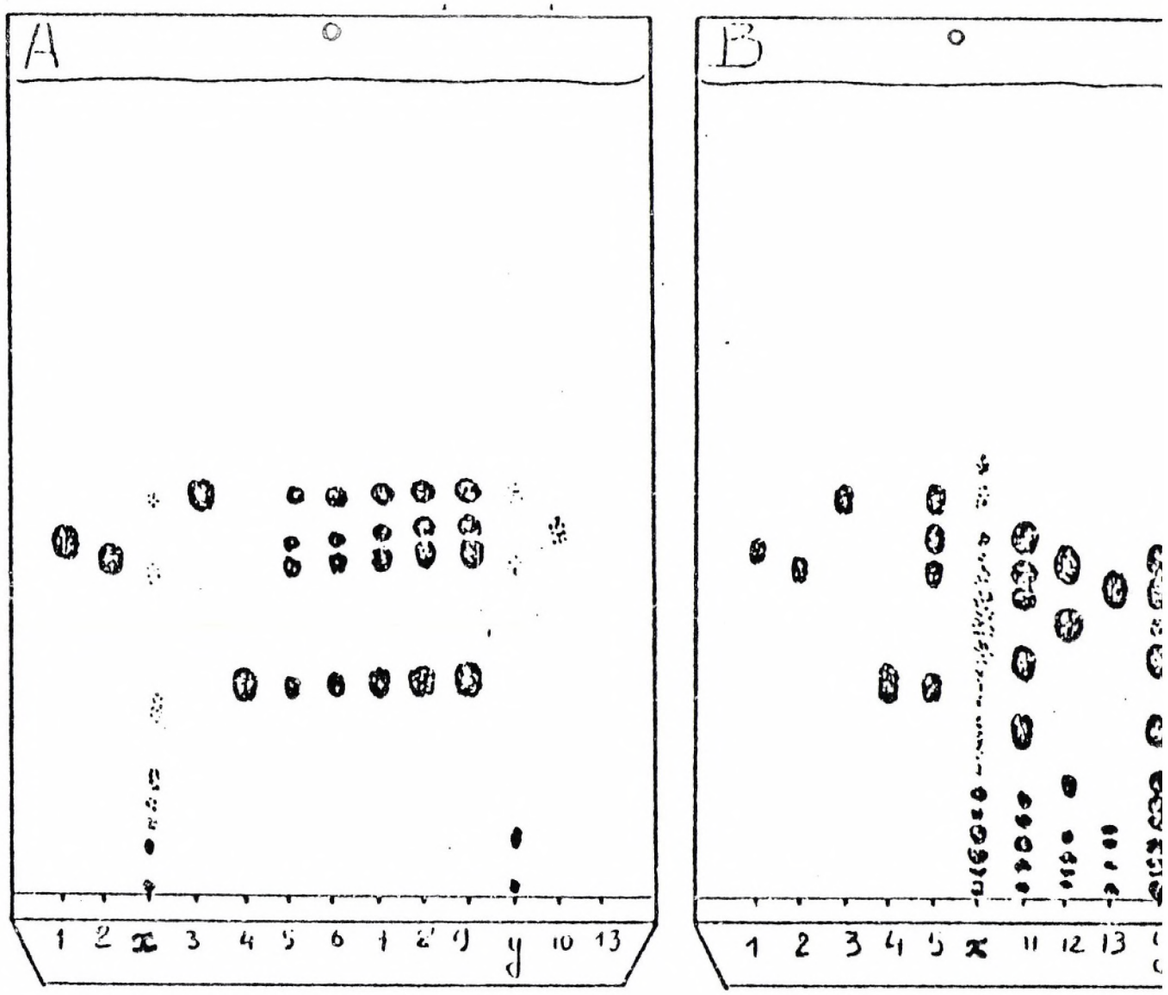
Séquence de migration des amino-acides :

dépôt n° 10 : lys + arg + his + asp + ser + glu + thr + ala + pro + AB + val + met + try + phe + ile + leu.
seul décelable : try.

dépôt n° 11 : lys - his - ser - glu - (thr + ala) - AB - val - ile - leu - try.

dépôt n° 12 : arg - asp - gly - leu - pro - met - phe.

dépôt n° 13 : orn - asn - gln - cit - tyr.



Résultats numériques chez l'Abeille :
(p. moles/mg Poids frais)

	Tête		Abdomen (intestin + corps adipeux)	
Composés	DQC	NNH	DQC	NNH
Adrénaline ...	0	0	3,3	...
Tryptophane ..	...	28,0	...	2,5
Nor-adrénaline	1,0	...	4,90	...
Dopamine	4,3	6,7	9,2	5,2
Dopa	0,27	0,23	1,1	0,7

(D'après la littérature : Bourdon et al., 1977, Arch. Internat. Physiol. Bioch., 85, 945-947, présence de noradrénaline dans les Abeilles mortes : tête 0,24 p. moles / mg ; abdomen : 0,38 p. moles / mg).

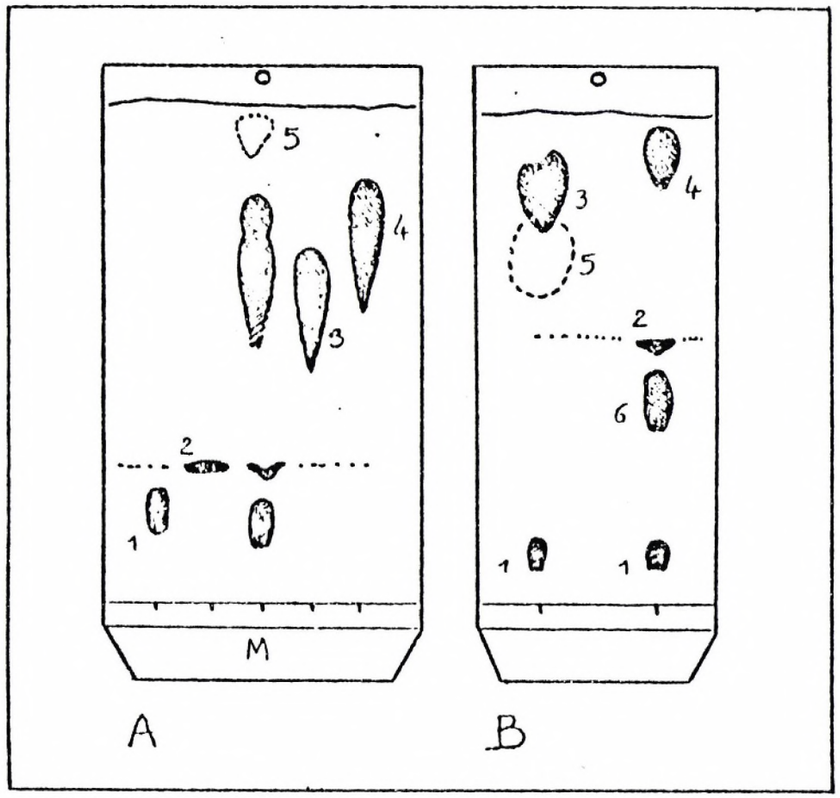


fig. 9 - Chromatographie des cations sur couches de cellulose non tamponnées, avec les éluants suivants : A = nº[1], B = nº[3].

1 = Mn^{++} 3 = Fe^{++} 5 = Zn^{++} (tache claire)
2 = Cu^{++} 4 = Fe^{+++} 6 = Pb^{++}

Réactif : acide rubéanique suivi de vapeurs ammoniacales.

Eluants :
(1) Acétone - HCl (ION) - eau (95-2,5-2,5)
(2) " " " (95-1,5-3,5)
(3) Méthyl-éthyl-cétone - méthanol - HCl (ION) - eau (90-5-2,5-2,5)
(4) " " " " " " (85-10-3-2).

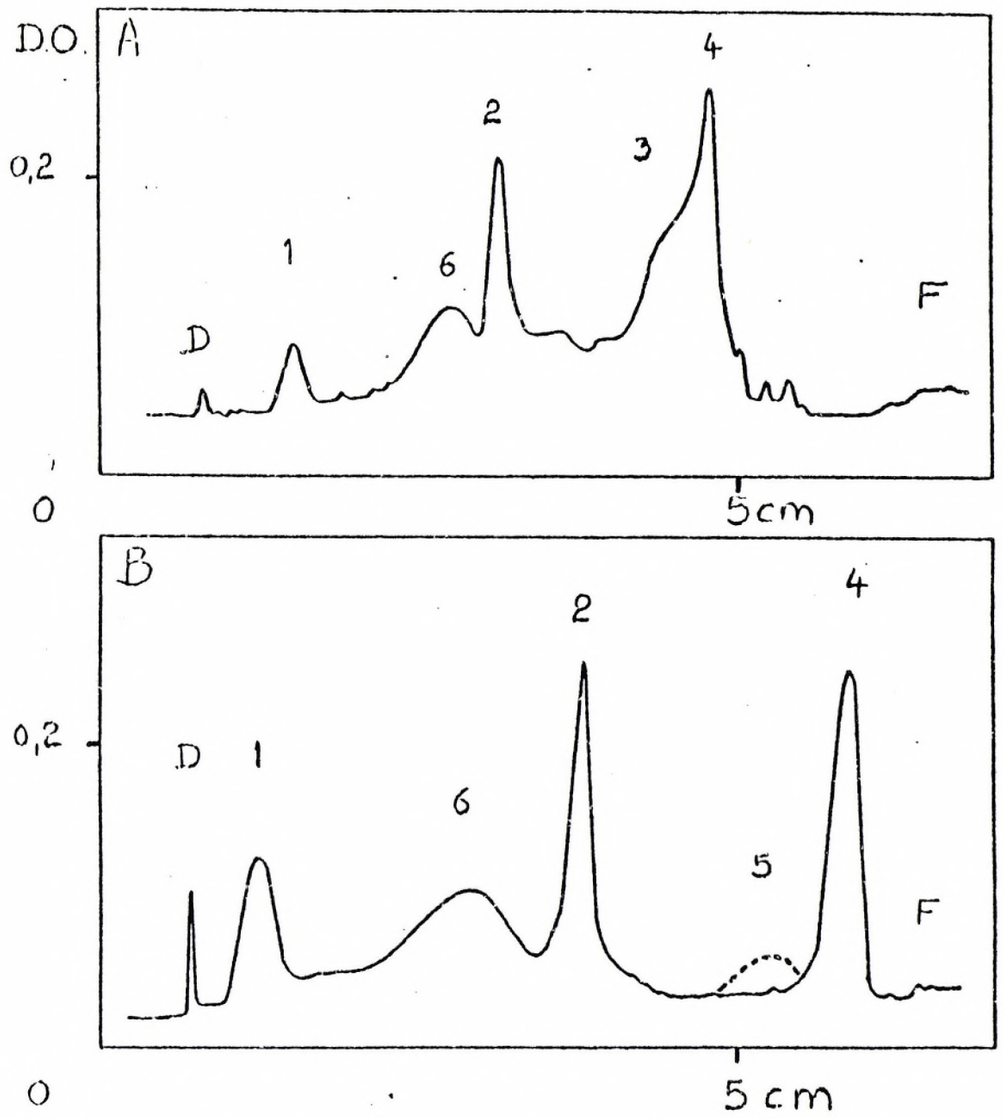


fig. 10 - Enregistrements photométriques de chromatogrammes de cations sur couches de cellulose (lumière blanche).

Eluants : A = nº 3 , B = nº 4 , D = départ, F = front.

1 = Mn^{++} 3 = Fe^{++} 5 = Zn^{++} (D.O. inversée)
2 = Cu^{++} 4 = Fe^{+++} 6 = Pb^{++}

Réactif : acide rubéanique puis vapeurs ammoniacales.

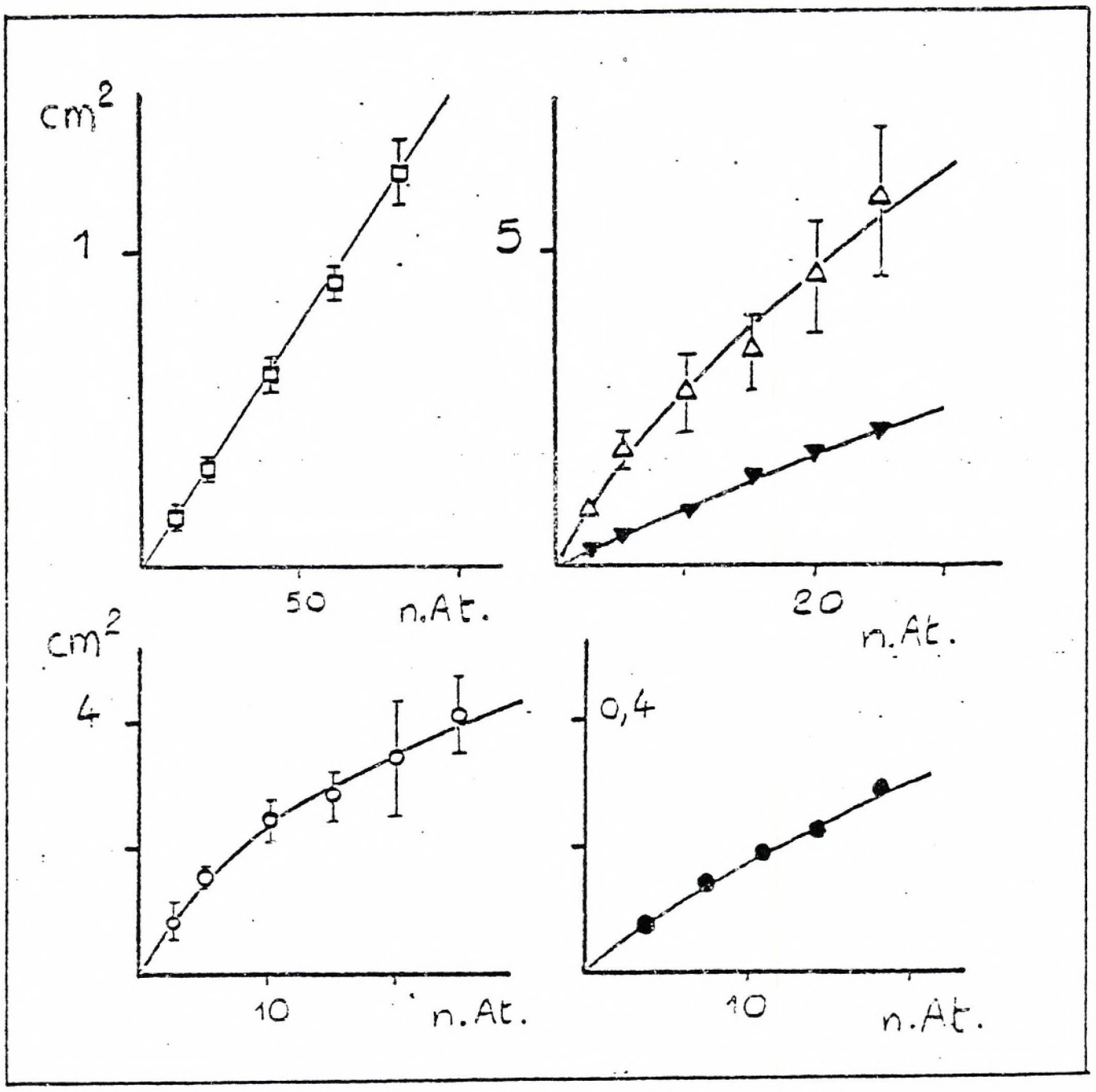


fig. 11 - Etalonnage des cations sur couches de cellulose.

Réactif : acide rubéanique puis vapeurs ammoniacales.

Enregistrements en lumière blanche (moyennes obtenues à partir d
3 plaques différentes). □ = Mn^{++}, Δ = Fe^{+++}, ▼ = Fe^{++}, O = Cu^{++},
● = Pb^{++}, (n.At) = nano-Atome-gramme (forme ion-gramme).

Tableau 6 - Paramètres d'étalonnage photométrique de quelques cations métalliques sur couches de cellulose (MERCK) après révélation par l'acide rubéanique et les vapeurs ammoniacales. (N.At. = nano-Atome-gramme).

cations	x	p $(cm^2)^x$/n.At.	limite de sensibilité (n.At.)
$Fer^{(+++)}$	1,31	0,380	0,13
$Fer^{(++)}$	1,05	0,091	0,50
$Cuivre^{(++)}$	1,47	0,308	0,16
$Plomb^{(++)}$	1,19	0,012	4,2
$Manganèse^{(++)}$	1,04	0,015	3,5

c) Etalonnage du ^{14}C par C.C.M. et autoradiographie.

L'analyse des courbes d'étalonnage obtenues à partir de la C.C.M. de leucine (u) ^{14}C (M.B., Thèse d'Etat), en utilisant les méthodes récentes décrites dans Analyt. Biochem. (cf. paragraphe a)) a permis d'affiner les bases quantitatives qui permettront, au Laboratoire de Biochimie de faire appel, dans l'avenir, aux traceurs radio-actifs. Les principaux résultats sont illustrés par les figures 12 et 13.

d) Ouvrage de synthèse sur " l'Analyse Biochimique Quantitative par nano-C.C.M. ".

L'ensemble des résultats analytiques les plus saillants obtenus dans le domaine Végétal comme dans le domaine Animal, a été intégré dans un ouvrage initialement prévu chez Masson et proposé finalement, fin Avril, pour les Actualités Scientifiques (Masson/Inra).

Le fascicule décrit les principes généraux, les techniques les plus fiables, et fournit dans chaque cas des exemples d'applications numériques destinés à servir de jalons aux utilisateurs. La composition se présente de la façon suivante (seul reste à mettre au point l'index alphabétique " matières ").

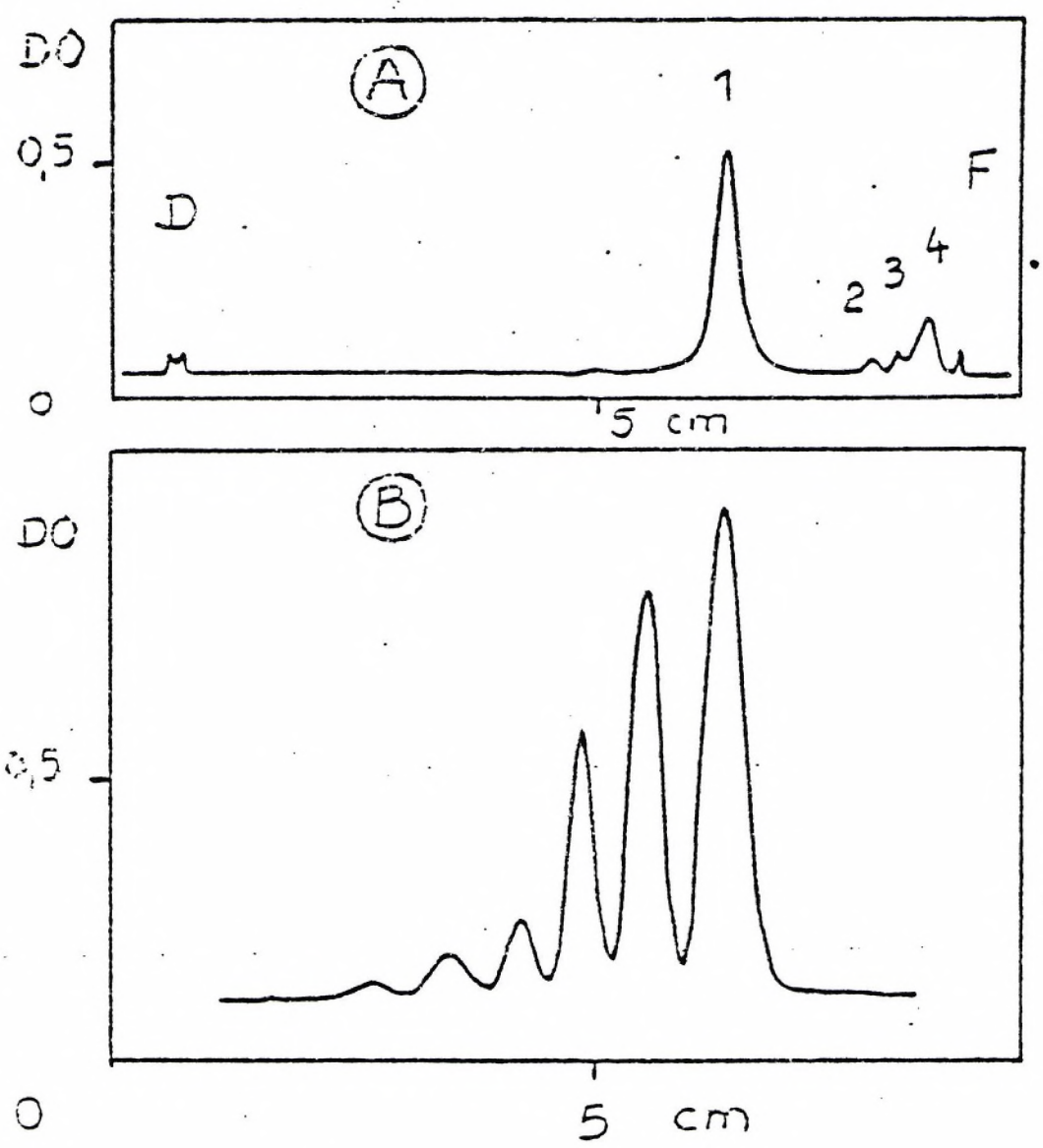


fig. 12 - Enregistrements d'autoradiogrammes de leucine (u)^{14}C chromatographiée sur plaques de polycarbonate, après 3 mois d'exposition au contact de feuilles Kodirex, puis révélation photographique.

A- Enregistrement longitudinal (50 pCi) montrant la pureté du produit : le pic de leucine (1) représente 88,5 % de la radio-activité totale, le reste provient des impuretés (2)(3) et (4).

D = départ, F = front.

B- Enregistrement transversal d'une gamme étalon d'activités croissantes respectives : 1-5-10-50-100-200 pCi.

fig. 13 - Etalonnage à "deux dimensions" de la radio-activité de la leucine (u)^{14}C sur plaques de polycarbonate exposées au contact de plaques kodirex.

A- Variations en fonction de l'activité.

Le calcul de régression en coordonnées bi-logarithmiques donne :

pour 10 pCi : ρ = 0,9884 P = 0,013 x = 1,146

50 pCi : ρ = 0,9967 P = 0,080 x = 1,240

100 pCi : ρ = 0,9976 P = 0,148 x = 1,210

200 pCi : ρ = 0,9917 P = 0,40 x = 1,32

B- Les pentes obtenues en fonction du temps d'exposition varient avec les activités croissantes. En coordonnées bi-logarithmiques : ρ = 0,9970, P = 0,002, x = 0,89.

C- Variations en fonction du temps d'exposition.

Le calcul de régression en coordonnées bi-logarithmiques donne :

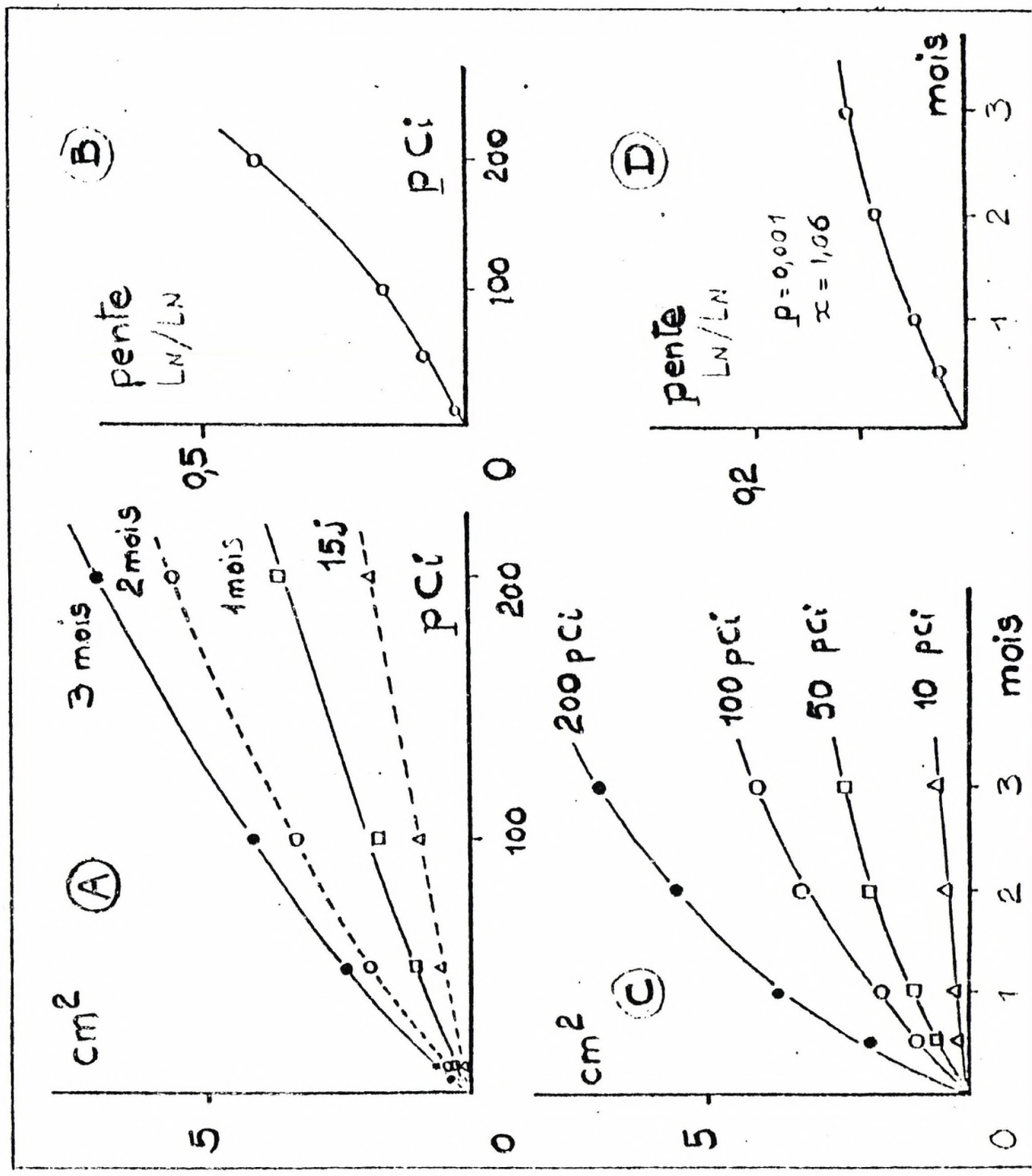
pour 15 jours d'exposition : ρ = 0,9985 P = 0,021 x = 1,075

pour 1 mois " " : ρ = 0,9978 P = 0,045 x = 1,144

pour 2 mois " " : ρ = 0,9987 P = 0,085 x = 1,147

pour 3 mois " " : ρ = 0,9993 P = 0,110 x = 1,140.

D- Les pentes obtenues en fonction des doses pour chaque durée d'exposition varient avec les doses. En coordonnées bi-logarithmiques, ρ = 0,9959 P = 0,001 x = 1,062.



L'ANALYSE BIOCHIMIQUE QUANTITATIVE PAR NANOCHROMATOGRAPHIE EN COUCHE MINCE

Table des matières

AVANT PROPOS 1

QUELQUES DEFINITIONS PREALABLES 3

RAPPELS HISTORIQUES 4

Première Partie :

METHODOLOGIE GENERALE .....6 à 33

Principes d'ensemble 6

I-1 — La préparation des échantillons 6

I-2 — Les couches de phase solide poreuse 9

I-3 — Le dépôt des échantillons 11

I-4 — Les cuves et les migrations 14

I-5 — La révélation 17

I-6 — La photo-densitométrie 20

I-7 — L'intégration des pics 23

Comment mesurer la surface :
- d'1 pic isolé 23
- de 2 pics se chevauchant partiellement 24
- de 2 pics se recouvrant totalement 27

I-8 — Calculs d'étalonnages et dosages 28

I-9 — Spectro-photo-densitométrie 33

Deuxième Partie :

APPLICATIONS PARTICULIERES .....35 à 110

Introduction 35

CHAPITRE I — Conseils pour la recherche des meilleures techniques d'élution 36

CHAPITRE II — L'analyse des glucides 38

CHAPITRE III — L'analyse des amino-acides 47

CHAPITRE IV — L'analyse des lipides 59

CHAPITRE V — Vitamines hydro-solubles 80

CHAPITRE VI — Acides carboxyliques 86

CHAPITRE VII — Les nucléotides 88

CHAPITRE VIII — Les hormones adrénergiques 91

CHAPITRE IX — Hormones végétales 96

CHAPITRE X — Pigments anthocyanes et flavonoïdes 100

CHAPITRE XI — Les alcaloïdes 106

CHAPITRE XII — Protéines fonctionnelles 110

CHAPITRE XIII — Les ions minéraux 114

Troisième Partie :

TECHNIQUES COMPLEMENTAIRES ..... 119 à 132

Introduction 119

CHAPITRE I — Radio-chromatographie 120

CHAPITRE II — Purifications par chromatographies transversales et passage en solution 128

CHAPITRE III — Spectro-photo-densitométrie directe sur plaque 130

CHAPITRE IV — Nouveautés techniques 131

II- ACHEVEMENT DU PROGRAMME Acide Ascorbique/Déhydro-ascorbique. (M. BOUNIAS)

Les résultats " définitifs " de l'étude comparée de l'action de diverses doses (de la carence à l'excès) d'acides ascorbique et déhydro-ascorbique sur l'amino-acidémie et la glycémie de larves de Lépidoptères ont été publiés dans Insect Biochemistry, 1980, 10, 521-527, ce qui met un terme à ce programme.

III- VARIATIONS DE LA COMPOSITION LIPIDIQUE DE DIFFERENTES PARTIES DU CORPS DE L'ABEILLE. (M. BOUNIAS)

L'analyse de la teneur en lipides des différentes classes a été effectuée comparativement dans l'hémolymphe, la tête, les muscles thoraciques, et l'abdomen. L'hémolymphe est la plus pauvre, sauf en ce qui concerne les acides gras qui ne sont plus abondants que dans l'abdomen. Les stéroïdes et les phospholipides montrent un maximum au niveau de la tête, de même que certains cérides. Les mono- di- et triglycérides sont accumulés dans l'abdomen, de même que les esters de stéroïdes. Les résultats numériques seront dégagés dans les prochains mois. Ils sont illustrés, ici, par la figure 15

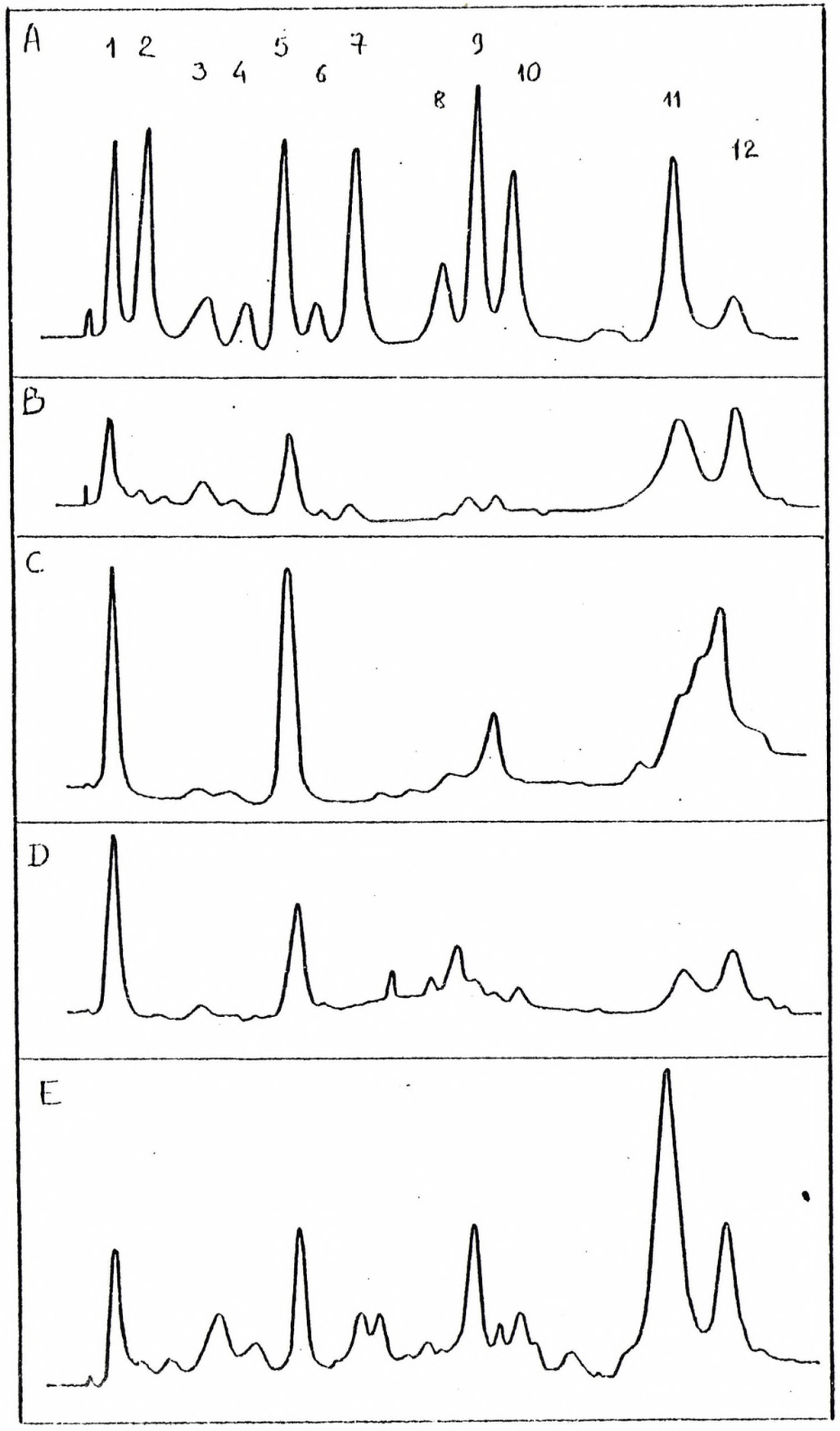


fig. 15- Applications à différentes parties du corps de l'Abeille butineuse de la chromatographie des classes de lipides sur couches de silice (MERCK).

A = étalons : 1 = phospholipides, 2 = mono-glycérides, 3 et 4 = acides gras (C16:1 et C24), 5 = stéroïdes libres, 6 = di-glycérides 1-2, 7 = di-glycérides 1-3, 8 et 9 = tri-glycérides (C12 et C18:1), 10 = esters méthyliques d'acides gras, 11 = stéroïdes estérifiés, 12 = cérides.

B = extrait d'hémolymphe (1 ul).

C = têtes.

D = thorax (1,5 mg).

E = abdomen (1,5 mg).

IV- BIOCHIMIE DE LA SURVIE ET DE LA MORT DES LARVES D'ABEILLES PLACEES DANS DIVERSES CONDITIONS TRAUMATIQUES. (M. BOUNIAS et M. DEBEVEC)

Les chercheur de l'équipe de Belgrade ont également choisi l'Abeille comme modèle biologique. Leur souhait, toutefois, était d'entreprendre des recherches sur le métabolisme glucido-lipidique en relation avec divers évènements extérieurs d'importance économique, parmi lesquels : l'action du froid (qui peut sévir à n'importe quel moment sur le couvain) et l'action de pesticides récents (Dimilin).

Les glucides avaient déjà fait l'objet de travaux approfondis au Laboratoire de Biochimie ainsi que l'analyse des variations quantitatives des classes lipidiques dans différentes parties du corps de l'Abeille.

L'ensemble des travaux a donc porté sur :

- les glucides
- les α-glucosidases
- les lipides
- les protéines de l'hémolymphe

Cela a permis au Laboratoire de Biochimie d'assurer un enseignement complet sur les méthodes suivantes :

- chromatographie en couche mince
- électrophorèse en gel d'acrylamide (protéines et enzymes)
- chromatographie sur colonne de gel de dextrane (avec spectrophotométrie)
- intégration des pics et calcul " Universel " d'étalonnage par la méthode du " coefficient d'expansion linéaire "
- enzymologie : cinétique et détermination des paramètres de HILL.

Ces techniques ont été appliquées à la mise en route d'un programme d'étude des larves d'Abeilles du 5e stade (ayant cessé de se nourrir) placées dans des conditions traumatiques, selon le schéma suivant :

A- larves placées hors de leurs alvéoles :

- de 0 à 6 H à 7ºC
- de 0 à 6 H à 20ºC
- de 1 à 7 jours à 20ºC

B- hémolymphe hors des larves :

- de 1 à 7 jours à -20ºC

C- enfin, l'évolution quantitative de la lipémie a été étudiée en fonction des stades du développement.

Cette phase du travail se poursuit avec l'étude complémentaire des températures + 2ºC et + 30ºC pour les larves, et celle des cinétiques de modifications biochimiques dans l'hémolymphe à différentes températures comprises entre - 20ºC et + 20ºC (à 25ºC : voir travaux de 1975 : C.R. 1er semestre).

- Les travaux d'électrophorèse ont été appliqués à l'étude du " découpage " des macro-molécules α-glucosidasiques par le di-thio-threitol. On observe une forte réduction des formes à haut poids moléculaire au profit de l'apparition de formes à bas poids moléculaires. Le rapport molaire entre oligomères et polymères est de l'ordre de 50.000/400.000 soit 1/8 (figure 16).

Il est très important de souligner que dans l'hypothèse de 2 sites actifs par oligomère, la théorie exposée dans les rapports 1978 et 1979 permet d'envisager 16 sites pour le complexe fonctionnel soit pour les valeurs du coefficient de HILL considéré comme rapport des ordres partiels n_S/n_E (substrat/enzyme) :

pour 8 sites occupés : n = 1

7 sites occupés : n = 0,875 (cf larves)

9 sites occupés : n = 1,125 (cf adultes butineuses)

etc.

Ces données confirment donc tous les résultats exposés antérieurement.

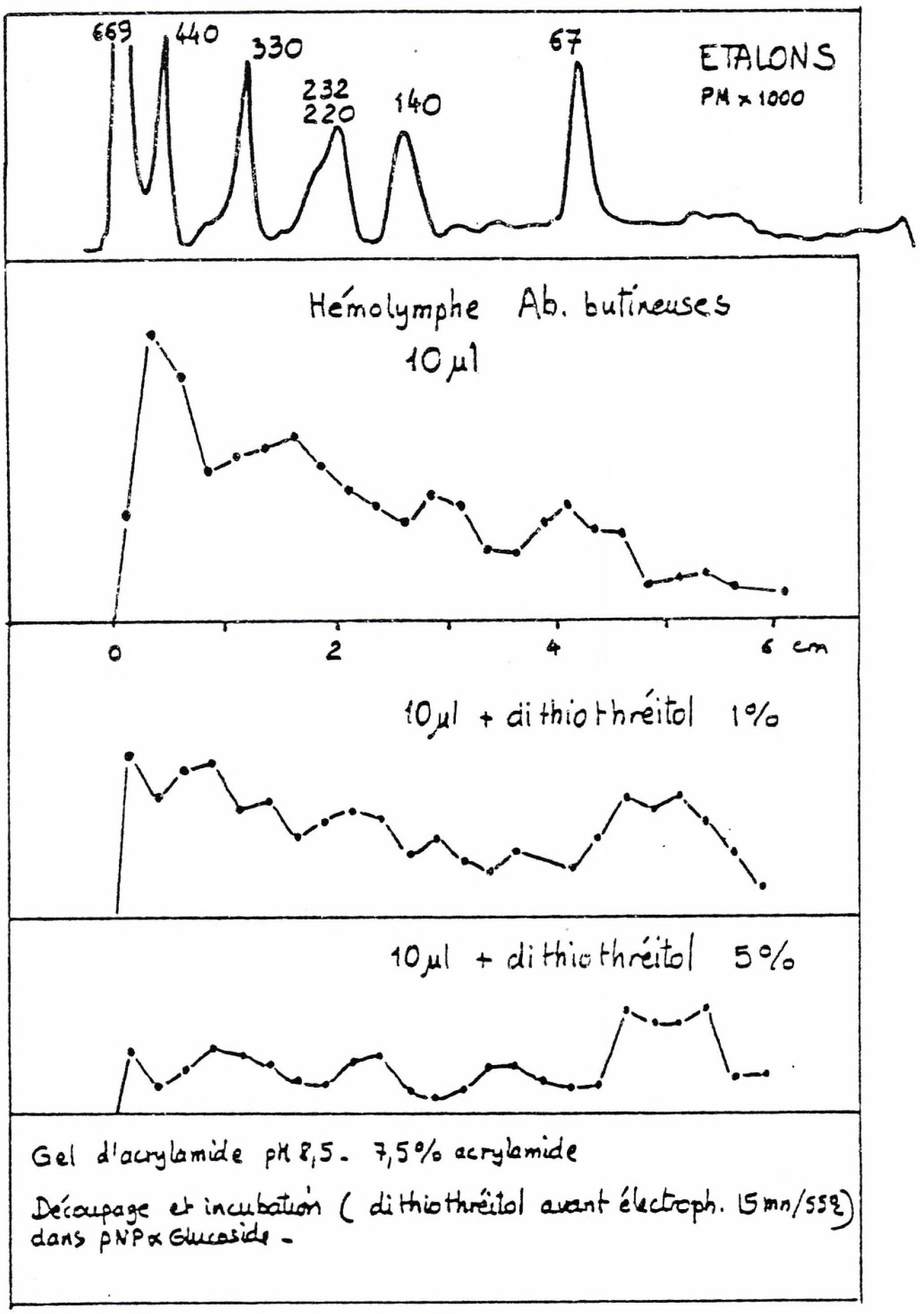


Fig. 16 - Dissociation des complexes α-glucosidasiques de haut P.M. de l'hémolymphe d'Abeille par le dithio-thréitol.

— Les déterminations de la glycémie et de la lipémie dans les différentes conditions décrites, sont pratiquement achevées. Quelques données numériques préliminaires figurent dans les tableaux 7, 8 et 9.

Tableau 7 - Modifications à court terme de la lipémie et de la glycémie de larves conservées à 7ºC et à 20ºC, expression en mM (phospholipides : µg/µl).

	Témoins (33ºC)	7ºC			20ºC		
		1H	3H30	6H30	1H	3H30	6H30
Phospholipides	2,97	3,86	7,60	4,18	4,28	—	3,66
Monoglycérides	—	—	—	—	—	—	—
Acides gras	0,20	0,37	0,26	0,29	0,33	0,10	0,73
Stéroïdes	1,09	2,11	0,92	1,25	2,00	0,42	1,66
Diglycérides 1-2	—	—	—	—	—	—	—
Diglycérides 1-3	0,12	0,17	0,08	0,10	0,17	—	0,10
Triglycérides	0,23	4,42	2,39	2,20	4,10	0,33	11,12
Esters de Stéroïdes	0,72	0,32	0,33	0,38	0,56	0,19	0,36
Tréhalose	46,5	102,3	190,8	225,2	79,0	150	209,6
Glucose	5,2	4,6	11,2	10,5	7,2	4,9	18,3
Fructose	2,3	2,44	8,0	5,2	2,2	4,8	5,7
Polyholoside 1	—	—	5,6	1,5	1,2	5,8	9,9
Polyholoside 2	9,6	3,0	8,8	29,0	12,4	2,0	19,6

Tableau 8 - Modifications à long terme de la lipémie et de la glycémie de larves L5 conservées à 7ºC.

(expression en mM sauf : phospholipides en µg/µl)

* Milieu pour essai d'induction d' -glucosidases bactériennes par leur substrat à partir d'extraits de larves à l'agonie, en milieu de culture sur tréhalose 100 mM.

	Bouillon de culture*	1 j	2 j	4 j	5 j	Agonie	mortes
Phospholipides		2,29	3,49	3,39	2,59	2,44	2,89
Monoglycerides		—	0,30	0,07	—	0,07	1,72
Acides gras		—	—	—	—	0,33	15,20
Stéroïdes		0,13	1,22	0,33	0,08	0,18	1,08
Diglycérides 1-2		—	0,03	—	0,04	—	0,20
Diglycérides 1-3		0,01	0,13	0,03	—	0,02	0,14
Triglycérides		0,05	3,45	3,77	4,11	8,67	2,85
Esters ac. gras		—	0,23	0,29	0,27	—	0,29
Tréhalose	94	147,8	150,4	108,0	48,8	88,1	22,5
Glucose	—	7,5	30,4	24,5	31,5	38,8	123,4
Fructose	0,3	0,30	0,86	1,6	1,0	0,6	1,26
Polyholosides 1	0,01	0	0	0	0,0004	0,06	4,4
Polyholosides 2	0,03	0,004	0,008	0,0002	0,02	0,14	1,6
Polyholosides 3	0,02	0	0,02	0,006	0,02	0,2	6,4

Tableau 9 - Variations de la lipémie de l'Abeille au cours du développement (mM sauf phospholipides : µg/µl).

	L5	LM	NO	N2-3	N5	AO	Ab
Phospholipides	—	2,2	2,5	3,28	1,82	1,06	1,21
Monoglycérides	—	0,05	0,03	0,15	0,04	0,03	—
Acides gras	0,40	0,48	0,39	0,28	0,54	0,35	2,6
Stéroïdes	0,2	0,99	1,15	1,6	0,98	0,16	0,4
Diglycérides 1-2	—	0,04	0,03	0,06	0,11	0,01	0,05
Diglycérides 1-3 a	0,04	0,13	0,16	0,44	0,6	0,03	0,17
Diglycérides 1-3 b	—	0,06	0,17	0,45	—	—	—
Triglycérides a	—	0,08	0,19	0,03	—	—	—
Triglycérides b	—	0,04	0,12	0,05	—	—	0,5
Triglycérides c	0,12	36,2	73,0	57,6	12,8	0,06	0,24
Esters d'ac. gras	—	—	—	—	—	—	0,24
Esters de Stéroïdes	0,03	0,17	0,62	0,44	0,24	—	0,01

Nomenclature des stades (cf. Bounias, 1975. C.R. Acad. Sc., 285D, 53-56. 1876. Apidologie, 7, 263-275).

L5 = larves 5e stade position transversale.

LM = " " " position longitudinale.

NO = prénymphes.

N2-3 = nymphes blanches, yeux rose-marrons.

N5 = nymphes brunes, yeux violets.

AO = Abeilles naissantes (moins de 24H).

Ab = Abeilles butineuses.

— L'analyse des paramètres enzymatiques est en cours et demandera encore un temps assez long. D'ores et déjà, l'évolution de l'activité α-glucosidasique dans les larves conservées à 7ºC ou à 20ºC montre d'importantes différences. Dans l'un des cas (20ºC) il apparaît au bout de 6 H une cinétique à coopérativité positive montrant que dans des conditions traumatiques, l'enzyme des larves (normalement à coopérativité négative) peut rejoindre le caractère de celle des adultes butineuses, confirmant ainsi nos hypothèses sur une adaptativité cinétique d'un complexe homopolymérique plutôt que l'existence de molécules complètement différentes d'un stade à l'autre du développement.

D'autre part, les larves conservées à 7ºC présentent une grande stabilité biochimique et morphologique pendant des durées voisines de 5 jours. Elles connaissent ensuite une agonie de 24 heures environ, avec brunissement progressif (mélanisation) de l'hémolymphe. Au cours de cette période, l'activité des α-glucosidases augmente très rapidement jusqu'à atteindre une vitesse (V_M) comparable à celle des adultes butineuses. De récents travaux (Brandt, Hurlburt et Huber, 1979, Can. J. Biochem., 57, 1210-1215) montrent que la rupture des mitochondries du thorax de l'Abeille libère une importante activité α-glucosidasique (tréhalase). Le rapport des activités avant et après traitement atteint des valeurs de l'ordre de 1 à 36 sans changement notable de la valeur de Km.

Nos travaux montreront, au terme des calculs en cours, si le phénomène observé pendant la mort des larves est du même type (les paramètres V_M, K et n sont ici pris en considération systématiquement). De plus, une étude de l'action inhibitrice du glucose a été effectuée afin d'en comparer le mécanisme à celui observé chez les larves saines.

— Dans l'hémolymphe conservée à - 20ºC, les modifications biochimiques générales sont à première vue de faible amplitude, mais une étude minutieuse a permis de mettre en évidence certaines modifications de détails dont la connaissance revêtira une grande importance dans tout toutes les expérimentations futures nécessitant la conservation des extraits congelés pendant un temps relativement long.

– Les α-glucosidases " activées " provenant des larves en fin d'agonie on fait l'objet d'un premier essai de purification sur séphadex G-200 (colonne V_t = 52 ml, $V_0 \simeq$ 20 ml. Etalons haut et bas P.M. de chez Pharmacia).

Le spectre protéique observé (figure 17) correspond bien à celui déjà obtenu en électrophorèse avec plusieurs fractions de haut poids moléculaire, mais les α-glucosidases sont retenues (certainement par affinité avec les α-glucosides terminaux du gel) et sont éluées ici avec les fractions de protéines de P.M. $\simeq$ 100000. Cette propriété devrait permettre, par un 2e fractionnement en présence de glucose ou de tréhalose comme ligand pour contre carrer l'affinité avec le gel, ou par l'emploi d'un nouveau type de gel (hydroxyapathite enrobée HA ultrogel, p. ex., utilisé par Bourbouze et Percheron pour la résolution des osidases de sarrasin, à partir de 40 mg d'extrait lyophilisé, sur une colonne de 2 x 6 cm !) (comm. IBF), d'obtenir en 2 étapes un taux de purification extrêmement élevé.

A partir de fractions purifiées respectivement 7 fois et 115 fois (tubes nº 33 du 1er et du 2e fractionnement, figure 17), l'étude des propriétés cinétiques a été répétée et mise à profit pour l'étude de l'action des cations Mg^{++}, Mn^{++} et Zn^{++} à des concentrations variant de 0,005 à 12 mM. L'étude détaillée des résultats n'est pas terminée mais d'ores et déjà, il n'est pas apparu d'activation caractéristique telle que celle observée avec Mg^{++} sur les phosphatases alcalines de l'intestin d'Abeilles (figure 18).

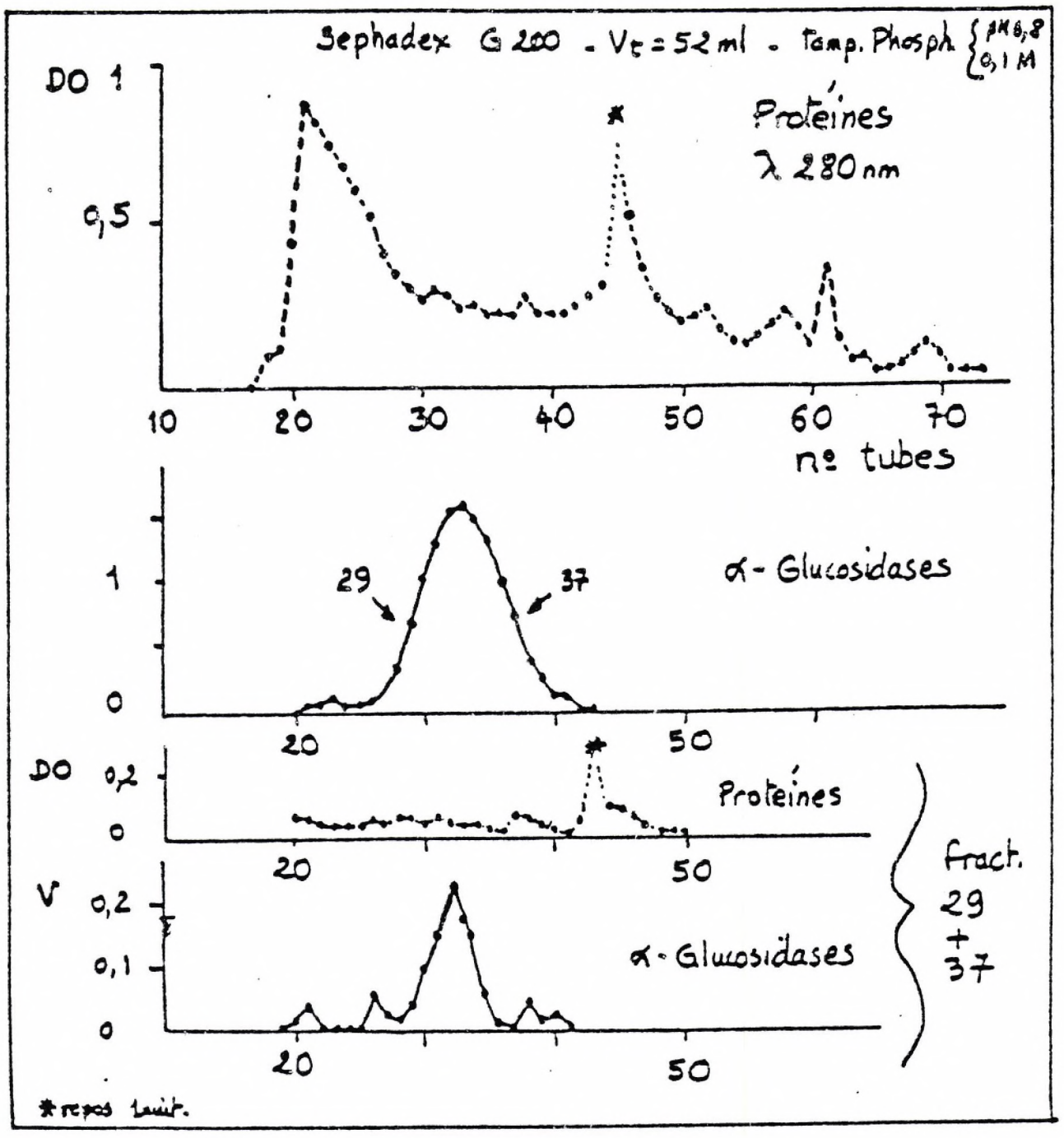


Fig. 17 - Profils d'élution des protéines totales (... ● ...) et des α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles sur colonne de gel Séphadex : deux stades successifs (purification de la fraction principale : 115 fois).

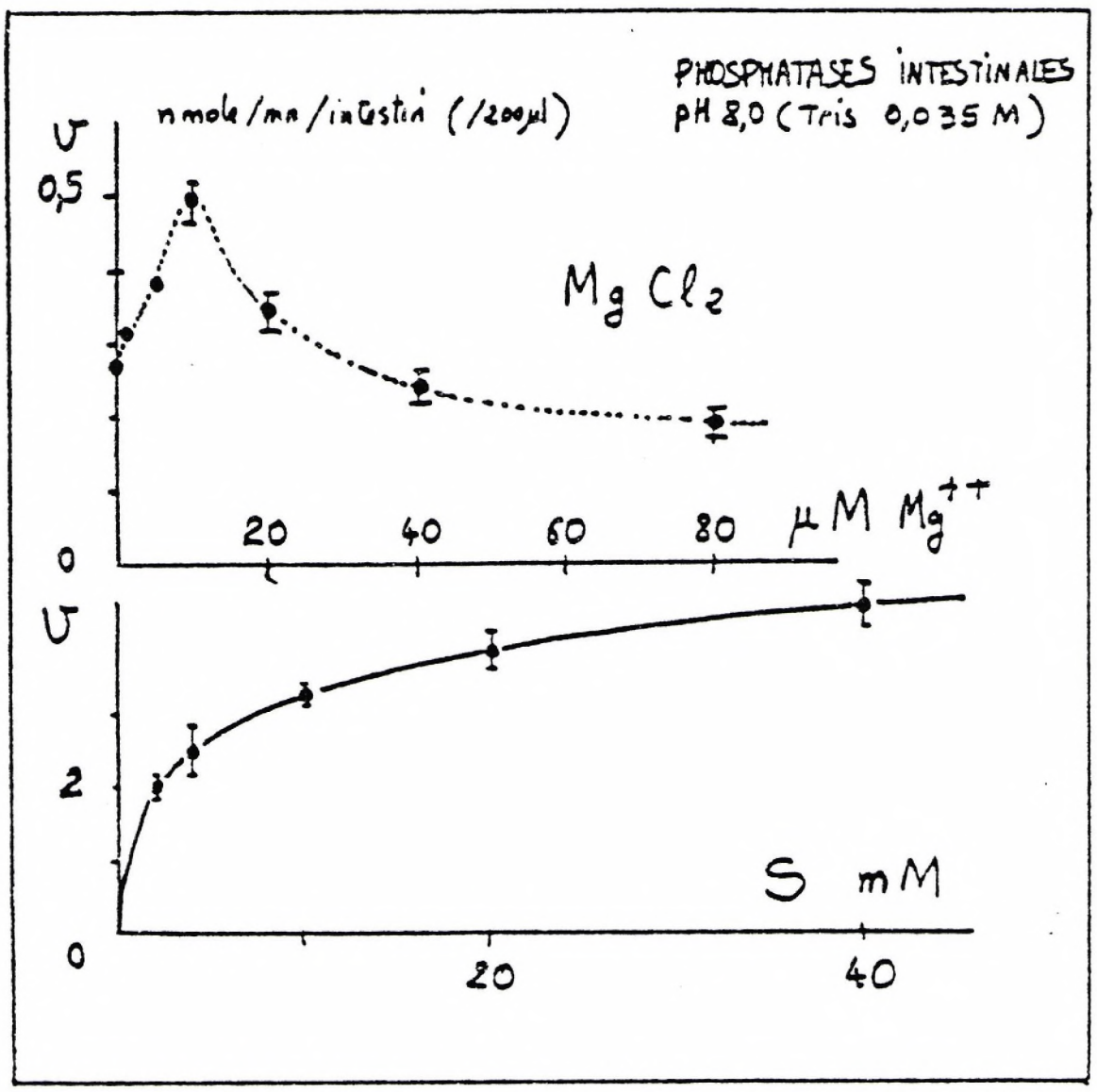


Fig. 18 - Action de Mg^{++} sur l'activité phosphatasique alcaline intestinale de l'Abeille. La courbe du bas (trait continu) rappelle la cinétique de saturation en l'absence de Mg^{++} ajouté.

V- ALTERATION DE L'ACTION HYPERGLYCEMIANTE DE L'ADRENALINE CHEZ L'ABEILLE PAR AUTOXYDATION PARTIELLE EN ADRENOCHROME.

(M. BOUNIAS et I. KRUK)

Les spectres d'absorption tracés en 1978 (C.R. nº 7) ont été examinés en collaboration avec le Dr. Kruk, de l'institut de physique de Stettin (Pologne), spécialiste actuel de l'oxydation de l'adrénaline. Les résultats ont donné lieu à deux manuscrits en co-signature. Le premier a été soumis à Gen. & Comp. Endocrinol. le 18/12 (on a envisagé également Hormone and Metabolic Research). Il y est décrit la cinétique d'oxydation de l'adrénaline en fonction de la concentration des solutions, y compris par chimioluminescence, et démontré qu'après une modification transitoire instable de la molécule 5 à 10 mn après mise en solution (formation de radicaux libres), l'oxydation conduisant à la formation d'adrénochrome stable débute réellement au bout de 1 heure, soit le temps nécessaire à la dissolution. La présence de 20 % d'adrénochrome affecte la réponse hyperglycémique de l'adrénaline en temps et intensité, aux faibles doses mais non aux doses élevées.

Le second manuscrit, qui paraîtra dans C.R. Soc. Biol., 175(1), 1981, détaille le mode d'action de l'adrénaline à très faibles doses (à partir de 5.10^{-4} nmoles), en particulier au niveau de l'équilibre intraglycémique : le rapport tréhalose/glucose diminue très tôt, alors même que la glycémie totale n'a pas encore varié. L'adrénochrome inhibe effectivement la réponse à faibles doses d'adrénaline mais ne fait que la retarder de 30 mn à doses élevées (2 mM). Les réactions hyperglycémiques sont suivies d'hypoglycémies compensatrices correspondant très exactement à la réponse de l'insuline injectée (Bounias et Pachéco, 1969, C.R. Acad. Sc., 289D, 201-204), en Temps et en Intensité. A cet instant, les fluctuations de l'équilibre glucose/tréhalose ne semblent plus dépendre que de la glycémie totale : l'adrénochrome agirait ainsi compétitivement sur les récepteurs adrénergiques de l'Abeille, sans intervenir dans la phase de la régulation de la glycémie liée au α-glucosidases.

VI- MECANISMES D'ACTION DU TREHALOSE SUR LES CINETIQUES p.N.P.α-D-GLUCOSIDASIQUES DE L'HEMOLYMPHE D'ABEILLE *in vitro*.
(M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN)

Ce travail constitue une étape préliminaire avant l'analyse détaillée des travaux effectués sur l'induction des α-glucosidases par leur substrat naturel : le tréhalose. Il s'agit de définir, ici, l'action *directe* du tréhalose sur l'activité enzymatique vis à vis du substrat artificiel, de manière à pouvoir distinguer l'effet inductif de l'action directe éventuelle imputable à une simple hypertréhalosémie.

L'étude de l'induction a porté sur une période de plus de 15 jours, de sorte que le présent travail a été effectué sur les naissantes A0 et sur les butineuses qui en constituent les limites physiologiques.

Une série de recherches systématiques bénéficiant d'un minimum de " bonne fortune " nous a permis d'étudier le phénomène dans deux cas distincts correspondant à des échantillons présentant à l'origine des cinétiques michaëliennes et non-michaëliennes. Voici le résumé des principaux résultats, qui vont paraître aux *C.R. Soc. Biol.* et aux *C.R. Acad. Sc.* :

A- Mécanisme d'action du tréhalose comme inhibiteur mixte de l'activité p.N.P.α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles : étude cinétique *in vitro*.

Le tréhalose se comporte comme un inhibiteur mixte de l'activité p.N.P.α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles : dans des échantillons présentant des cinétiques initiales de type michaëlien, il abaisse la vitesse maximale et augmente la valeur de la constante Km d'un même facteur, respectivement égal à 1,6 chez les naissantes et 1,3 chez les adultes. Les constantes de dissociation Ki et K'i correspondant respectivement à la fixation du tréhalose sur l'enzyme et sur le complexe (enzyme-substrat artificiel) sont égales à 62,5 et 168,7 mM chez les naissantes, et à 303,9 et 754,5 mM chez les butineuses. Le rapport K'i/Ki est invariant. Le coefficient de HILL de la fixation du tréhalose sur l'enzyme varie de 0,91 chez les naissantes à 1,38 chez les butineuses ce qui concorde avec les tendances non michaëliennes déjà observées pour cette enzyme. La dose I_{50} passe respectivement

de 98,3 mM à 358,3 mM. Cet accroissement, de même que celui des constantes de dissociation, coïncide avec la différence de tréhalosémie entre les naissantes et les butineuses des lots étudiés (figures 19 et 20).

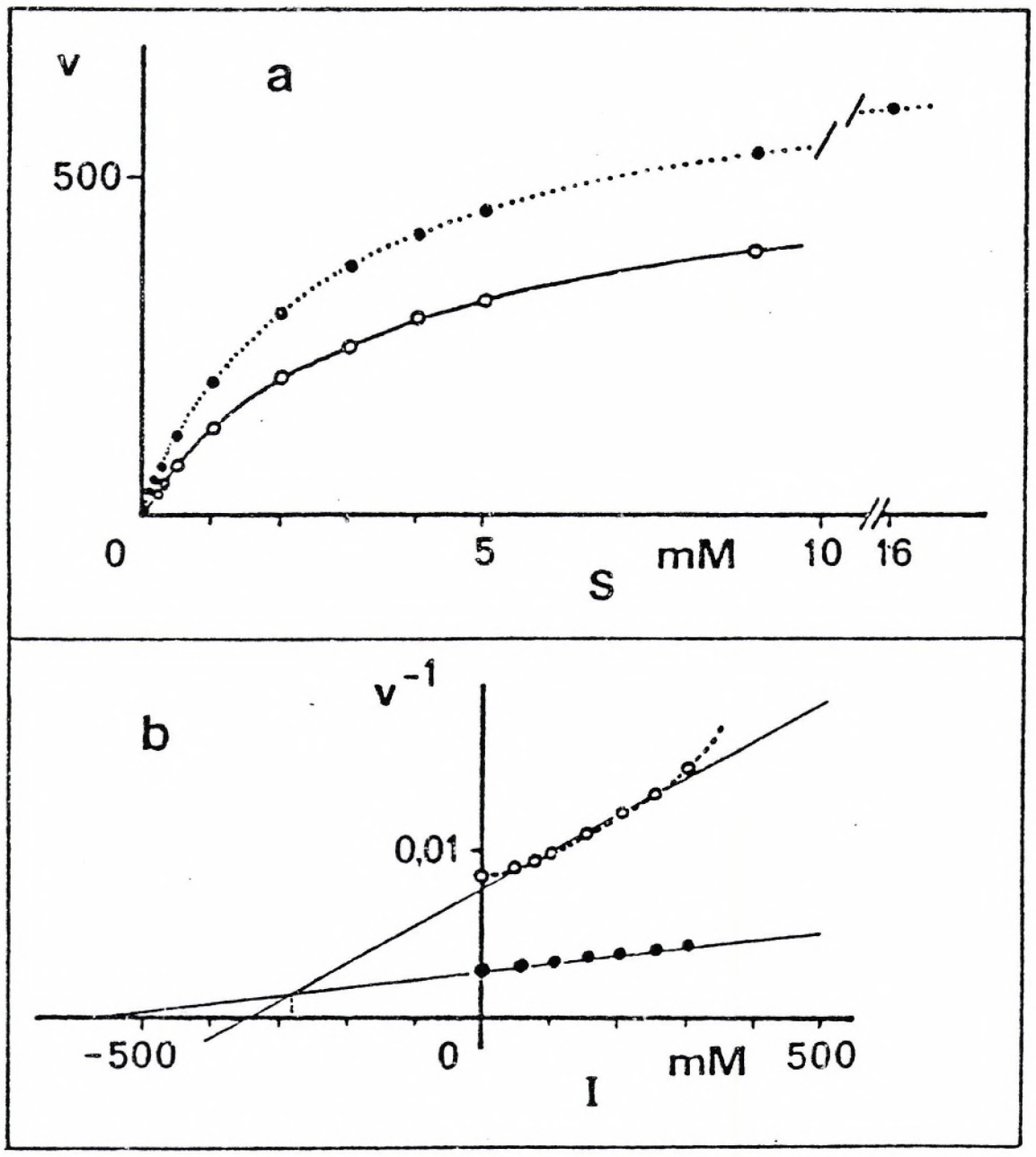


Fig. 19 — Action du tréhalose in vitro sur l'activité p.N.P.α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles naissantes :

a) Courbes de saturation témoin (··· ● ···) et en présence de 110 mM de tréhalose (—○—). Les vitesses s'expriment en $\mu M.mn^{-1}.\mu l^{-1}$.

b) Relation entre la vitesse de réaction et la concentration en inhibiteur (I) (tréhalose) pour : (Δ) S = 1 mM ; (●) S = 4 mM ; (○) S = 9 mM.

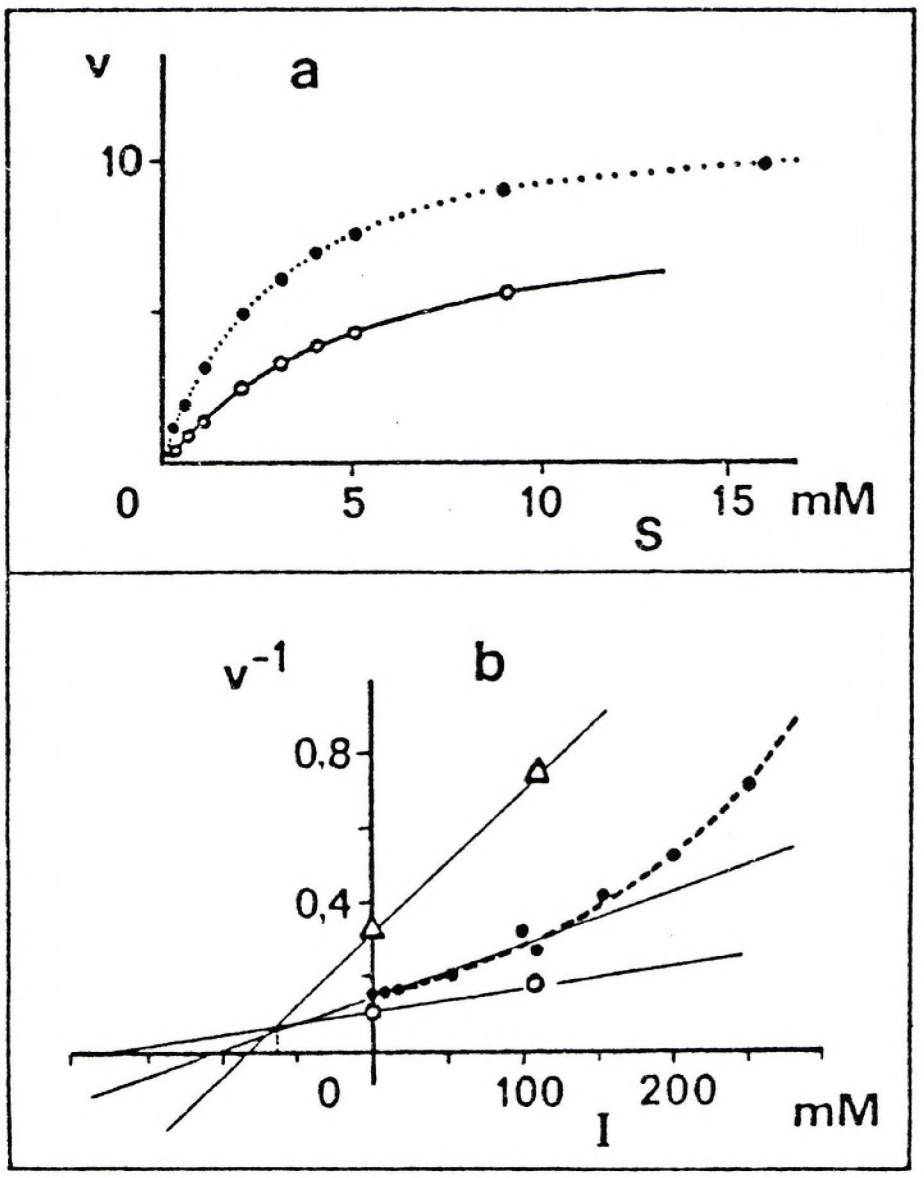


Fig. 20 — Action du tréhalose in vitro sur l'activité p.N.P.α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles butineuses :

a) Courbes de saturation témoin (···●···) et en présence de 200 mM de tréhalose (—○—). v s'exprime en $\mu M.mn^{-1}.\mu l^{-1}$.

b) Relations entre la vitesse de réaction et la concentration en inhibiteur (I) (tréhalose) pour : (○) S = 0,5 mM ; (●) S = 4 mM.

B- Atténuation de l'inhibition mixte (V + K) de l'activité p.N.P.α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles par le tréhalose *in vitro*, au moyen d'un mécanisme compensateur de type " n ".

Dans un échantillon d'Abeilles naissantes dont l'activité p.N.P.α-D-glucosidasique de l'hémolymphe présente une tendance à la coopérativité négative (n = 0,94) les manifestations cinétiques " michaëliennes " de l'inhibition par le tréhalose sont fortement atténuées (fi passe de 1,60 à 1,05) en contre partie d'un abaissement du coefficient de HILL de la réaction (n = 0,82). Cette interprétation est également compatible avec le calcul des paramètres michaëliens dans l'hypothèse transitoire d'un système à deux composantes superposées (figures 21 et 22).

La collaboration dans ce domaine se poursuit actuellement avec dialogue permanent par courrier et par télex.

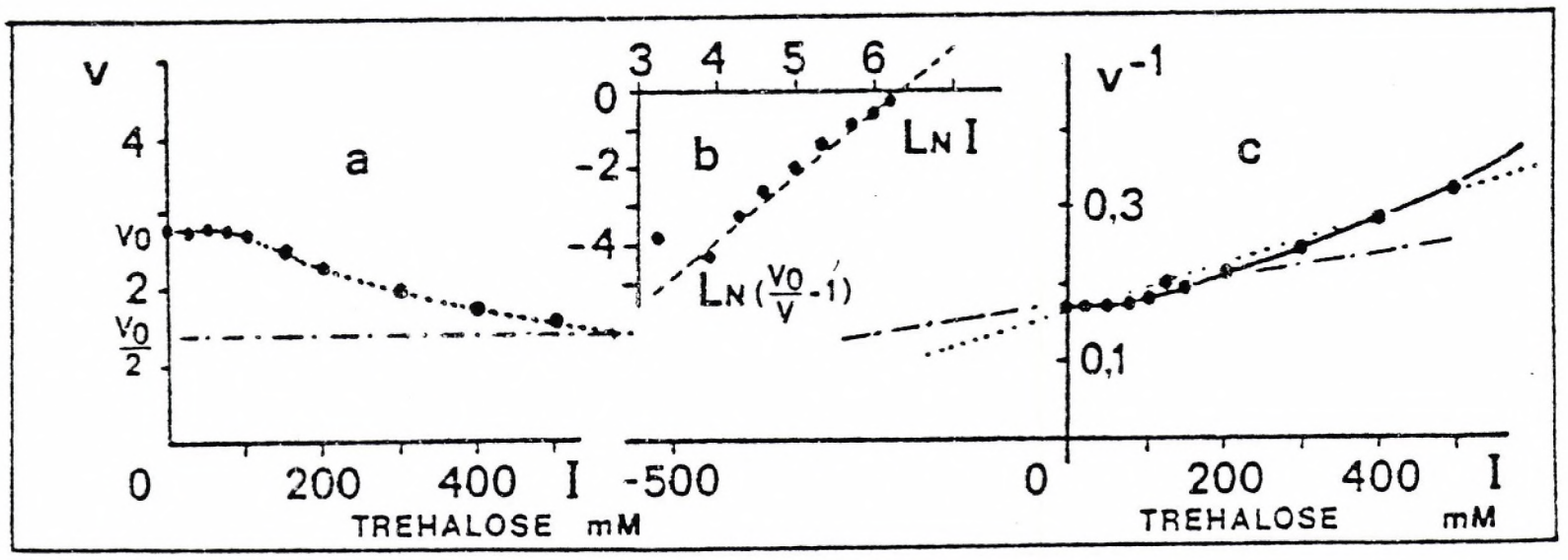


Figure 21. — Relations entre vitesse de réaction (v : $\mu M.mn^{-1}.\mu l^{-1}$) et concentration en tréhalose (I, mM). a) = relation directe. b) = forme logarithmique d'après Chou (2). c) = forme de Dixon (16) avec extrapolation illégitime.

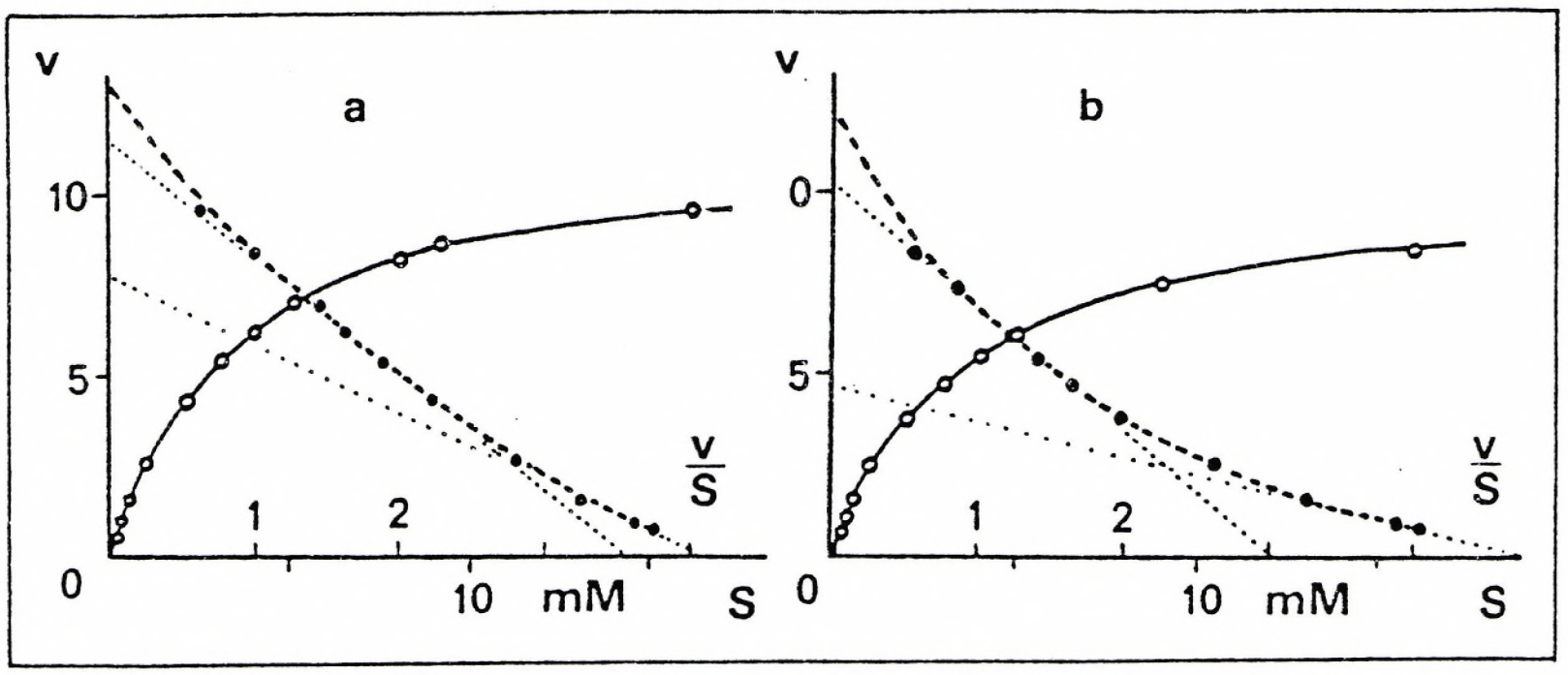


Figure 22. — Courbes de saturation exprimées en coordonnées directes (—O—) et d'après Augustinsson (10) (---●---). Les extrapolations en trait pointillé figurent les composantes superposées selon Fonlupt, Martinet et Pachéco (11). a) = témoins. b) = tréhalose : 125 mM in vitro.

VII- VARIABILITE INTER-RACIALE DE LA GLYCEMIE CHEZ L'ABEILLE. (M. BOUNIAS)

Sur un premier lot homogène de 4 colonies de chacune des races mellifica (M), ligustica (L), caucasica (C) et leurs hybrides (LxC)xM, l'analyse de variance à deux facteurs contrôlés a montré un effet hautement significatif des races, en ce qui concerne la glycémie, l'effet de différentes colonies de chaque race étant comparativement très faible (tableau 10). Cette étude va paraître début 81 aux C.R. Soc. Biol., 174(6), 1980.

Cette étude a été élargie aux relations intra-glycémiques (rapports tréhalose/glucose et glucose/fructose) avec 9 à 10 colonies de chaque race. Les conditions étant moins homogènes en raison de l'étalement de la période des prélèvements sur 1 mois, les résultats ont néanmoins confirmé la haute signification des différences inter-raciales (figures 23, 24 et 25). Les résultats complets discutés en fonction de l'origine métabolique des glucides de l'hémolymphe, selon le tableau 11, vont paraître début 81 dans Comp. Biochem. nº 916B.

APPLICATIONS — La glycémie des ouvrières peut être légitimement considérée comme douée des propriétés d'une variable contrôlée, et l'étude des corrélations avec le rendement revêt, dès lors, toute sa signification. Un premier manuscrit intitulé : " the workerbees glycemia as a racial index of honey production " est parvenu au J. Apic. Res. en décembre 80.

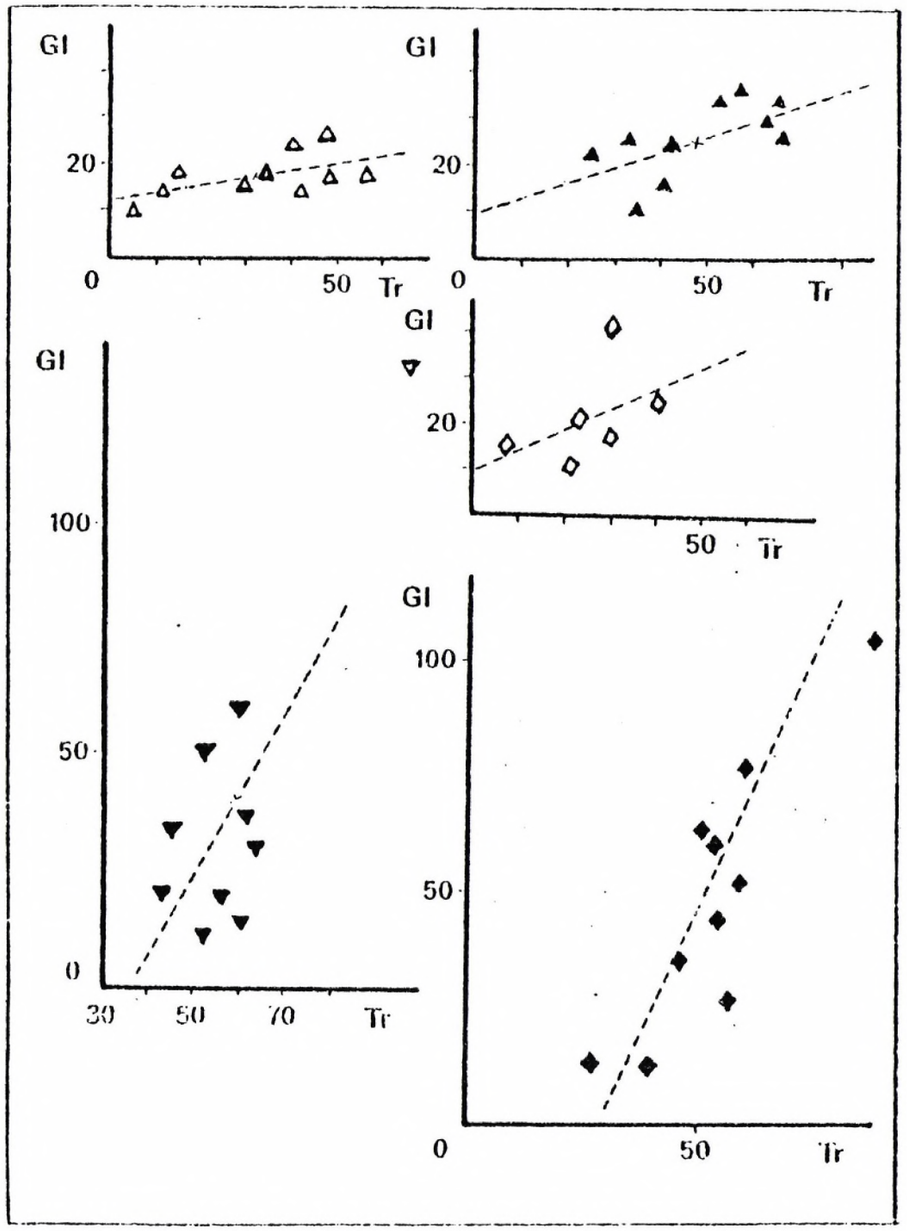
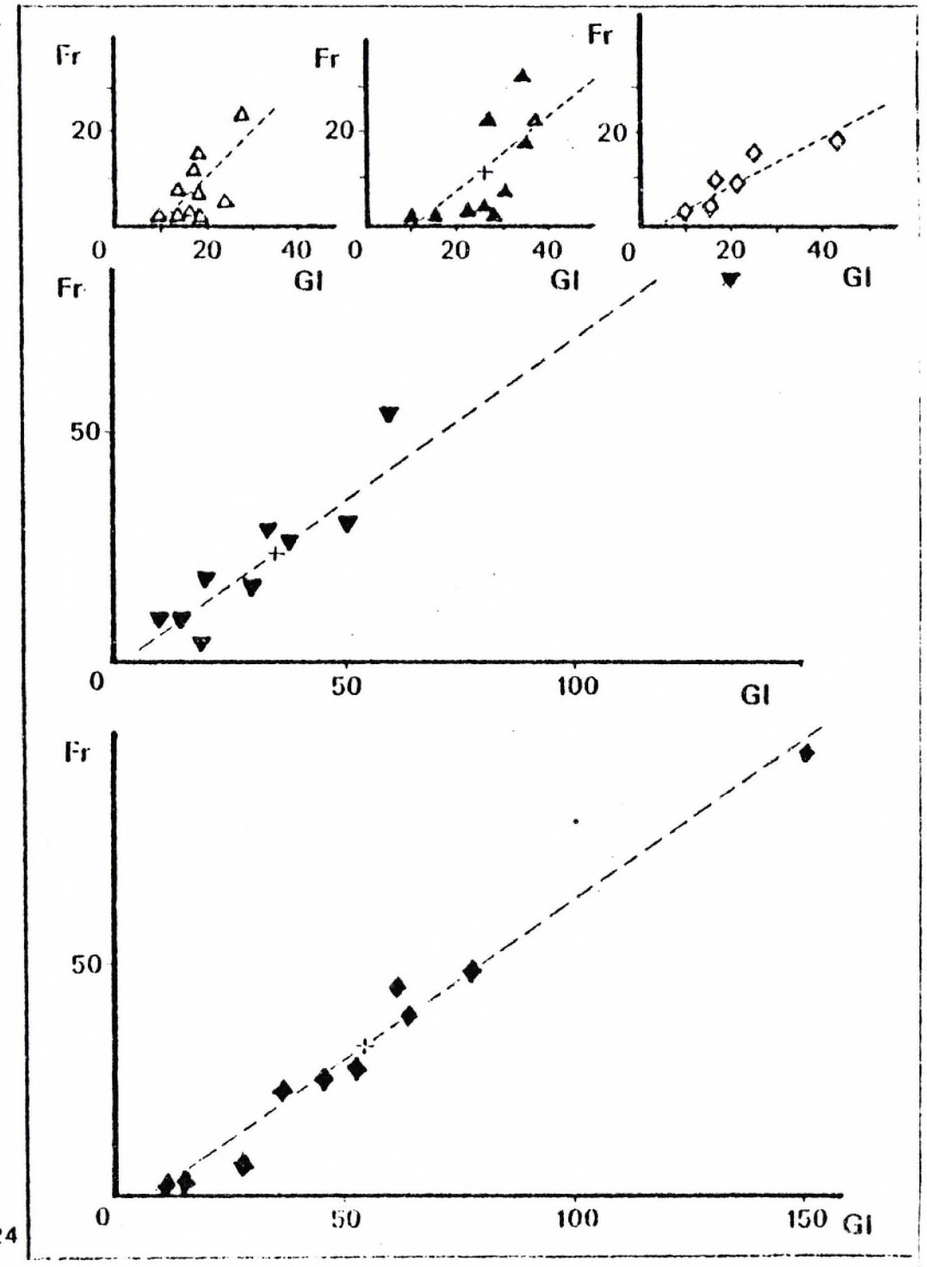


Fig. 23



F g. 24

Fig. 23 et 24 - Relations glucose/tréhalose (23) et fructose/glucose (24) dans l'hémolymphe d'ouvrières de chacune des races suivantes : (Δ) = ligustica ; (▲) = mellifica ; (▼) = caucasica ; (◇) = hybrides (LxC) (LxC) ; (◆) = hybrides (LxC)xM. Chaque point correspond à 10 individus d'une même colonie.

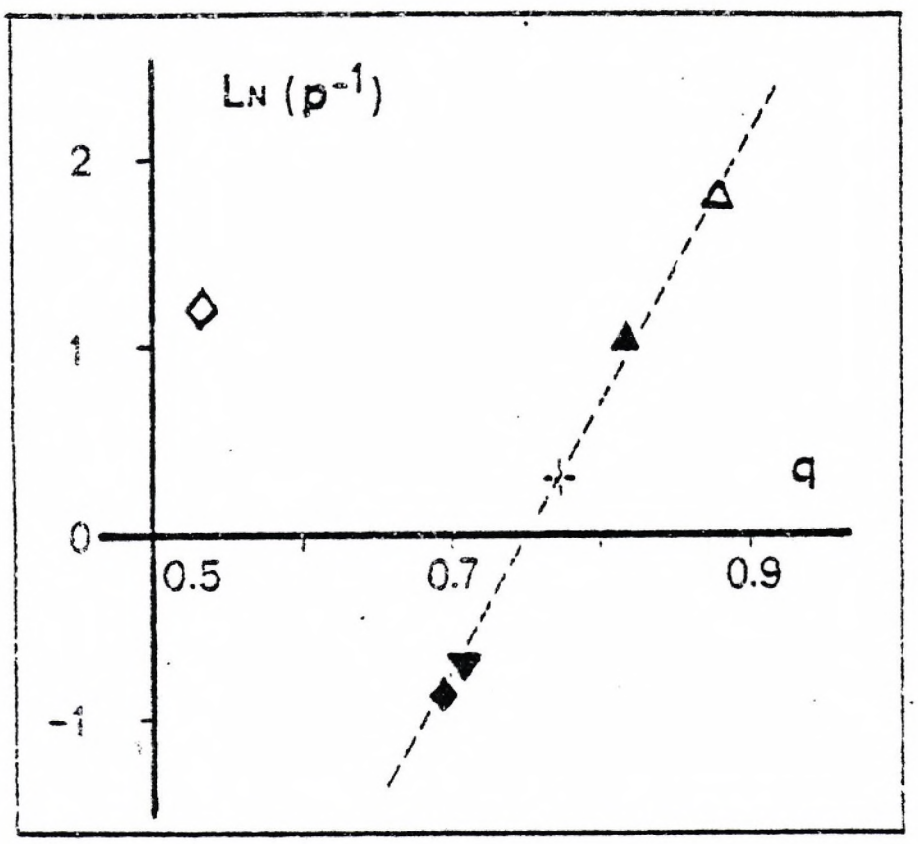


Fig. 25 - Correlations entre la pente (p) de la relation glucose/tréhalose et la pente (q) de la relation fructose/glucose au travers des mêmes races que sur les figures 23 et 24 : seuls les hybrides simples (LxC) sortent du cas général.

TABLEAU 10

Analyse de variance des facteurs " colonies de même race " (4 colonnes) et " races différentes " (5 lignes).

Paramètres calculés	Tréhalose	Glucose	Fructose
Moyenne générale	46,693	37,711	22,665
Variance générale	133,645	363,283	203,806
Sommes de carrés :			
Variabilité totale (T^2)	2672,910	7265,678	4076,130
Variabilité "lignes" (L^2) ...	1701,170	5998,419	3276,057
Variabilité "colonnes" (C^2) .	16,213	255,900	56,6446
Calculs de F :			
colonnes (F_C)	0,0764	1,0121	0,3048
d.d.l. v_1/v_2	3/12	3/12	3/12
lignes (F_L)	5,3522	17,793	13,220
d.d.l. v_1/v_2	4/12	4/12	4/12
Epreuve de F :			
Quotient $Q(F_C)$	0,9710	0,4213	0,8216
$1-Q = P(F_C)$	0,0284	0,5787	0,1785
Quotient $Q(F_L)$	0,01040	0,000055	0,000236
$1-Q = P(F_L)$	0,98960	0,999945	0,999764

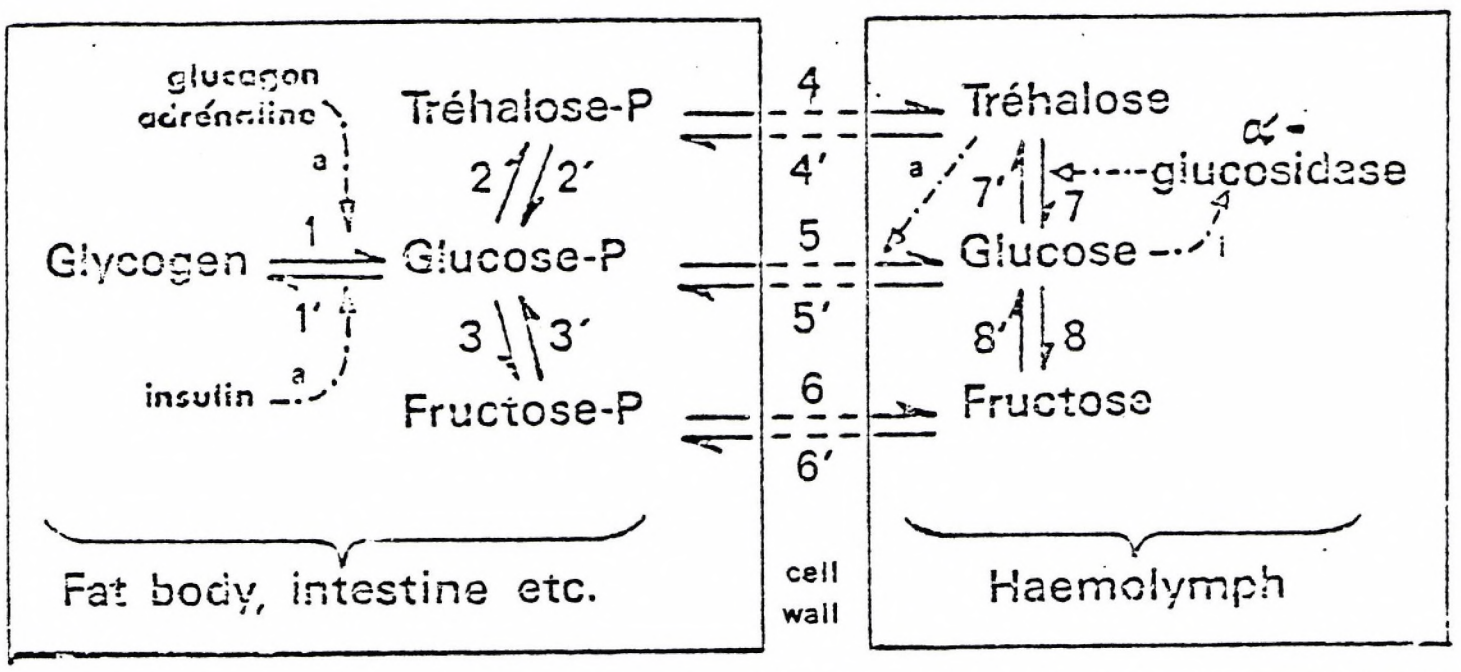


Tableau 11 - Origine métabolique des glucides de l'hémolymphe d'Insectes.

D'après la Bibliographie, les voies (1-1'), (2-2'), 4, 5, (3-3'), 7, sont connues.

VIII- PERSPECTIVES.

L'orientation insufflée aux travaux du Laboratoire de Biochimie par les résultats acquis au cours des dernières années, permet d'envisager, à long terme, un programme d'ensemble centré sur l'appréciation des " potentiels biotiques " ou de la " vigueur biologique " au moyen de caractères biochimiques approfondis (régulation du métabolisme énergétique glucido-lipidique).

Au cours d'une réunion au Laboratoire de Biochimie, le 3 décembre 1980, en présence d'une commission d'experts et des Chefs de Départements de Zoologie et de Phytopharmacie, cette orientation générale a été approuvée et il a été convenu de retenir, parmi les nombreuses applications possibles, deux thèmes prioritaires :

- la toxicologie biochimique de certains pesticides (et de leurs résidus) chez l'Abeille, en tant qu'Insecte utile (pollinisateur)
- le déterminisme biochimique des caractères de migration ou de diapauses de Lépidoptères (nuisibles) dont l'affaiblissement par élevages artificiels sur de nombreuses générations constitue un aspect corollaire non négligeable.

Dans cette optique, certaines collaborations extérieures ont été contractées à la demande d'organismes extérieurs :

. Université de Belgrade (pour mémoire) : orientation toxicologique.

. C.N.E.S./GEPAN : pour l'étude des effets biochimiques éventuels liés aux champs énergétiques accompagnant la présence de phénomènes aérospatiaux non identifiés.

. Université de Bordeaux : mode d'action chez l'Insecte d'une insuline endogène isolée chez l'Abeille.

D e u x i è m e P a r t i e

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I- BILAN BUDGETAIRE.

A. Le Budget de fonctionnement (soutien de Programmes) du Laboratoire de Biochimie avait été discuté par le Département de Zoologie fin 1979 et fixé à 21 000 F soit une augmentation de 5 000 F.

Les dépenses, au 31/12/80 s'ordonnent comme suit :

1- Reports 1979 : F + 500,00
E - 606,95
Total - 106,95

Comptes	Nature	Montants facturés	Cumul
634-1-1	matériel de laboratoire .	6118,36*	
634-1-2	produits chimiques	6646,15	
634-1-3	xérocopies	1177,55	
634-1-4	fournitures de bureau ...	1296,76*	
634-1	.....		15238,42
634-3	documentation	3980,42*	
634-4	affranchissement courrier	1208,60	
641-1	déplacements	712,80	
Total général			21140,24

* Engagements sur compte de transition (ou report 80) :

634-1-1 (matériel de laboratoire) .. 922,15
634-1-4 (fournitures de bureau) 170,00
634-3 (documentation) 688,65

Total 1780,80

Total général (facturé + engagé) 22921,04

Au 31 décembre le Bilan s'établit comme suit :

Attribution ..... : 22000,00

Report 79 ..... : -106,95

Reste attribué ... : 20893,05

Montant facturé .. : 21140,24

Dépassement ..... 247,19 soit 1,18 % du crédit disponible relativement aux sommes facturées.

2027,99 soit 9,7 % du crédit disponible relativement au total (facturation + engagements de transition).

B. Le Budget d'Equipement n'a pas été défini, par suite d'évènements administratifs d'origine extérieure.

La demande annuelle, régulièrement adressée en 5 exemplaires au département le 11/09/79 conformément à l'instruction du 18/07/79 (BH.RPUG/553), s'établissait comme suit :

Equipements complémentaires / Etuve .. : 1500 F) Le crédit 1978 ayant
/ Polaroïd : 3200 F) été amputé de 6000 F

Equipements nouveaux / Thermostat .... : 8600 F

/ Conductivimètre : 5800 F

/ Balance 0,1 mg : 14000 F

Total ..... : 33100 F

Au 7 janvier 1981, rien n'est défini à ce sujet.

Une demande de report E → F de 2000 F a toutefois été formulée en DM nº3 de fin d'année.

C. ATP " Méthodologie Biochimique en Agronomie ".

La demande formulée en 1979 portait sur l'achat d'un micro-polarimètre enregistreur (base : 66696,04 F TTC en 1979, soit une demande finale avec accessoires, etc., effectuée selon une évaluation totale de 82000 F).

Une attribution a été effectuée au titre de 1981 pour un montant de 50000 F soit 61 % du montant demandé ...

Les modalités d'utilisation de ce crédit vont donc être rapidement réexaminées (sera-t-il possible d'acquérir un micro-polarimètre enregistreur, dans ces conditions et dans quels délais les morceaux acquis de manière obligatoirement éparse pourront-ils constituer un tout fonctionnel ?).

D. Prévisions.

L'équipement " lourd " du Laboratoire de Biochimie devrait comprendre, dans un proche avenir, un spectro-photo-densitomètre (type ZEISS) pour remplacer le photomètre actuel usé à l'extrême et aux performances largement dépassées par la qualité des chromatogrammes, ainsi qu'un " luminomètre " destiné à la mesure de l'ATP et aux cinétiques d'ATP-ase.

II- BILAN ADMINISTRATIF.

L'insertion début 1980 d'une " anastomose administrative " a considérablement alourdi la gestion – jusqu'ici sans problèmes – du Laboratoire. Plusieurs blocages ont été enregistrés (remboursements de frais d'affranchissement, répartion sur comptes et D.M. nº1 et 2, attribution d'équipement par le Département, informations au Chef de Service, informations en temps voulu au Chef de Service, prévisions d'attributions propres au Laboratoire à partir de 1981, inventaire de l'équipement attribué au Laboratoire de Biochimie, etc. etc.). Les nouveautés en matière de contre-signature ont en outre inutilement retardé toutes les opérations de gestion, et il a fallu ajouter aux pièces administratives habituelles un nombre de pièces supplémentaires de pure forme.

Il ne s'agissait, heureusement, que de mesures transitoires propres à accompagner un transfert de rattachement du Laboratoire de Biochimie.

III- NOUVELLES STRUCTURES.

A l'issue de la réunion du 3/12/80 en présence d'une commission

composée de MM. Descoins, Dubois, Labia, Laviolette, Mauchamp et Hurpin, l'intérêt des travaux du Laboratoire de Biochimie vis à vis des objectifs du Département de Phytopharmacie est clairement ressorti.

La commission a souligné la nécessité de renforcer la structure du Laboratoire de Biochimie au niveau du personnel(poste ACT 2B, Bourse d'accueil de thésards) ainsi que des locaux. Le principe du transfert du Laboratoire de Biochimie au Département de Phytopharmacie a été adopté d'un commun accord, et la ré-installation matérielle du Laboratoire devrait s'effectuer dans le rez-de-chaussée du bâtiment " Phytopharmacie " (Pollution Atmosphérique) d'Avignon, occupé provisoirement par le S.A.D. (qui doit être lui-même transféré définitivement dans de nouveaux locaux. Il est évident que le déménagement ne pourra avoir lieu avant que le nouvel emplacement soit libéré, d'abord, et aménagé, ensuite (cloisons, effluents etc.).

PUBLICATIONS 1980

A- Nouveaux titres parus (ou parution incessante).

(1) BOUNIAS, M. (1980). Cinétiques d'Action de la nor-adrénaline, de la dopa et de la dopamine sur la glycémie de l'Abeille in vivo. Arch. Internat. Physiol. Bioch., 88(1), 93-98.

(2) BOUNIAS, M. (1980). N(1-naphtyl) éthylène diamine dihydrochloride as a New Reagent for Nanomole Quantification of Sugars on Thin-Layer Plates by a Mathematical Calibration Process. Analyt. Biochem., 106, 291-295.

(3) BOUNIAS, M. et BOUNIAS, A. (1980). Micro-analyse quantitative par C.C.M. de quelques métabolites de l'hémolymphe d'Insectes. II- Les amino-acides libres. Analusis, 8(7), 287-295.

(4) BOUNIAS, M. (1980). Modifications inter-raciales de la glycémie chez l'Abeille (Apis mellifica L.). C.R. Soc. Biol., 174(6).

(5) BOUNIAS, M. (1980). Nanochromatographie en couche mince des acides aminés. Coll. " Dosage des Ac. aminés " - THEIX, 13-14 Mai 1980.

(6) BOUNIAS, M. (1980). A comparison of Haemolymph levels and inter-relations of trehalose, glucose and fructose in workerbees from different races and hybrids. Comp. Biochem., nº 916B.

(7) BOUNIAS, M. et KRUK, I. (1981). Altération de l'action hyperglycémique de l'adrénaline chez l'Abeille par autoxydation partielle en adrénochrome avant l'injection. C.R. Soc. Biol., 175(1).

B- Manuscrits adressés pour Publication.

(1) BOUNIAS, M. (1981). The workerbee glycemia as a racial index of honey production. J. Apic. Res. (Acc. R. 28/10/80).

(2) BOUNIAS, M. et KRUK, I. (1981). Comparative effects of different adrenaline concentrations on the Honeybee glycemia after injection of pure hormone or partially autoxidized in adrenochrome. Gen. Comp. Endocrinol. (envoi 18/12/80).

(3) BOUNIAS, M. et MORGAN, M.R.J. (1981). Mécanisme d'action du tréhalose comme inhibiteur mixte de l'activité p.N.P.α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles : étude cinétique in vitro. C.R. Soc. Biol. (envoi 8/01/80).

(4) BOUNIAS, M. et MORGAN, M.R.J. (1981). Atténuation de l'inhibition mixte (V + K) de l'activité p.N.P.α-D-glucosidasique de l'hémolymphe d'Abeilles par le tréhalose in vitro au moyen d'un mécanisme compensateur de type " n ". C.R. Acad. Sc. (envoi 8/01/80).

C- Ouvrage.

BOUNIAS, M. (1981). L'analyse biochimique quantitative par nano-chromatographie en couche mince sur supports souples. Actualités Scientifiques et Agronomiques inra/Masson Ed. (envoi 18/06/80).

CONCLUSION

En dépit de conditions peu favorables, la " productivité scientifique " du Laboratoire de Biochimie a continué à progresser, en 1980, et l'impact extérieur, au " baromètre des tirés à part ", s'exprime par une moyenne de 20 à 50 demandes par semaine, au cours des derniers mois ; cela s'est traduit concrètement par de nouvelles demandes de collaborations extérieures présentant un intérêt direct vis à vis des objectifs du Laboratoire. Tout récemment, des contacts ont été établis avec les Départements de Recherches Biochimiques et Pharmacologiques de la Société BAYER, en vue de l'étude, chez l'Abeille, du mécanisme d'action de différents inhibiteurs des α-glucosidases étudiés en vue d'une utilisation en thérapeutique humaine. Du reste, les travaux récents du Laboratoire de Biochimie sur les glucides et les α-glucosidases ont suscité une majorité de réactions de la part d'Instituts de Recherches Médicale et Pharmacologique publics et privés ... Cela n'est pas le fruit du hasard, et correspond bien au désir d'orienter les Recherches du Laboratoire dans une direction située à la charnière entre la toxicologie biochimique positive (protection générale de la faune utile, reconnue ou présumée) et négative (lutte spécifique contre un nombre limité d'organismes nuisibles). Dans ce domaine, il est indispensable d'assurer une prospection à long terme, et l'intérêt pharmacologique éventuel des Insectes comme sujets d'épreuves, en parallèle (ou en préalable) avec les Vertébrés peut indiscutablement donner lieu tôt ou tard à la découverte de voies d'action biochimiques inattendues spécifiques de certains Ordres et nettement situées, par définition, à l'égard des Vertébrés. Le jeu en vaut la chandelle car au moindre succès apporté par l'expérimentation, les bénéfices pourraient être multiples ! (D'ailleurs, une ATP n'a-t-elle pas été demandée, voici quelques années, pour la recherche d'inhibiteurs des tréhalases d'Insectes ?! Même s'il n'a pas été sollicité à ce sujet, le Laboratoire de Biochimie n'en est peut-être pas moins l'un des mieux placés, dans ce domaine spécialisé ...).

Tout ceci confirme le bien-fondé du transfert de rattachement au

Département de Phytopharmacie du Laboratoire de Biochimie qui est toutefois appelé, par vocation, à conserver avec la Zoologie certains liens privilégiés.

L'année 1981 sera nécessairement difficile, en raison de l'hypothèque d'un déménagement dont la période n'est pas encore réellement prévisible et de l'incertitude budgétaire inhérente à cette situation de transition. Mais lorsque ces difficultés sont le présage d'un Renouveau, elle ne peuvent qu'être franchies allègrement. S'il fallait une seule conclusion, ce serait celle-ci !

Le 8 janvier 1981

A N N E X E : PROJETS F/YU

P R O G R A M

Previous notes

1. In accepted Program, the proposed theme ic enough broad which is favorable on our oppinion, becouse it permits certain enlargement of the space in developmental course of our scientific problem.

In the scope of this title there are a lot possibilities for current corrections, depending on the results of our experiments.

2. We consider thet we should primarily forsee in 1981 Program the following:

a) to continue on the both sides the field of research already begun.

b) preliminary experiments involving some chemical factors from the seric of pesticides, in agreament with you, and eventualy on the basis of ours recent results studied on "Dimilin" on honey-bee larvae, (explanation followed, N° 5).

c) investigation of the possible induction of calorigenic effects by catecholamines (adrenaline, nor-adrenaline and precursors) on honey-bee different ontogeny, exposed to temperature changes of the enviroment.

3. This general outline of the Program should be realisticaly estimate and in agreament with you to choose probably, a part of mentioned experiments.

General outline for the Program

1. Short term effect of time and temperature influence on honey-bee larvae (L_5)
It would be a continuation of previous experiments of honey-bee behaviour on temperature +7 and +20°C; new points would be on +2 and +30°C, so that temperature zone from +2°C to +30°C would be complete and covered.

Duration of time treatment will be dependant on the results of experiments.

2. Long term effects of time and temperature exposition on honey-bee larvae (duration 1-? days) with possible changes of temperature, time and other factors.

3. In connection with point 2 and 3, having in mind practical problems, we suggest an experiment with keeping larvae on certain low temperature (for instance +7°C), returning them again on normal one (of the hive), with possible changes in eventualy biochemical consequences of the brood when it becomes cold.

4. Repetitions of the experiments under the conditions given in point 1 and 2, but now with hemolymph out from the body. (You already know).

5. Histochemical examinations on theratogenic changes induced by "Dimilin" on pupal stage of honey-bee.

The effect of "Dimilin" on chitinase during moulting.

Examination of subletal doses as working one, of "Dimilin" during moulting.

* We didn't forget the question of "biochemical death". What do you think about investigation on this problem in aspect of:

- organismic level
- cytological level
- genetical level

Collaborators in Program: (jugoslavian side)

1. Dr. Dragutin Popeskovic, professor (Veterinary Faculty-Belgrade)
2. Mirjana Debevec, M.Sc., asistent professor "
3. Dr. Marko Injac, associate professor (Institute for plant protection-Belgrade)
4. Nada Tomić, post graduate student
5. Zoran Jovanović, graduate "
6. Nevenka Dujin, laboratory technician (Veterinary faculty-Belgrade)